

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Papel de las Diacilglicerol Quinasas en la regulación de la respuesta inmune

Tesis doctoral

Denise Soutar Moroni

Madrid, Mayo 2013

El trabajo presentado en esta memoria ha sido realizado en el Departamento de Inmunología y Oncología del Centro Nacional de Biotecnología (CSIC), bajo la dirección de la Dra. Isabel Mérida de San Román.

La realización de esta tesis ha sido posible gracias a una beca de Formación de Personal Investigador (FPI) del Ministerio de Ciencia e Innovación.

Según vamos adquiriendo conocimiento, las cosas no se hacen más comprensibles, sino más misteriosas

Albert Schweitzer

ABREVIATURAS	3
SUMMARY	9
INTRODUCCIÓN	13
1. La respuesta inmune	15
1.1 El sistema inmune	15
1.2 La respuesta inmune adaptativa	15
2. Tolerancia y autoinmunidad	16
2.1 Tolerancia central.....	16
2.2 Tolerancia periférica	16
2.3 Control de la respuesta adaptativa por las células T reguladoras	17
3. Tolerancia, respuesta inmune y cáncer	19
4. Control de la activación o tolerancia de los linfocitos T	20
4.1 La activación de los linfocitos T	20
4.2 La anergia en linfocitos T	22
5. Las Diacilglicerol quinasas en el control de la tolerancia y activación de las células T ..	22
5.1 Diacilglicerol quinasas en linfocitos	23
6. Papel de la IL-2 en la activación y diferenciación de los linfocitos T	26
6.1 Regulación de la expresión de la IL-2 y su receptor	26
6.2 IL-2 y la diferenciación de las células T CD8	28
6.3 IL-2 y la diferenciación de las células T CD4	29
6.4 Papel de la IL-2 en el desarrollo y la actividad de las Treg	31
OBJETIVOS	33
MATERIALES Y MÉTODOS	37
1. Reactivos	39
2. Líneas celulares y medios de cultivo	39
3. Cepas de ratones	40
4. Aislamiento de linfocitos primarios de ratón	40
5. Ensayo DGK	40
6. Electroforesis de proteínas y Western Blot	41
7. Estimulaciones de linfocitos T primarios de ratón	41
8. Citometría de flujo	42
9. Análisis por Luminex de producción de citoquinas en los sobrenadantes	43
10. Extracción de RNA y obtención del DNA copia (cDNA)	43
11. PCR semicuantitativa	43
12. PCR cuantitativa	44
13. Modelos de inducción de tumores	44
14. Análisis estadístico	44

RESULTADOS	45
1. Expresión de DGKs en linfocitos T	47
2. Contribución de la DGK α a la actividad DGK en linfocitos T	48
3. Papel de la DGK α en la activación de los linfocitos T	49
3.1 Contribución de la DGK α a la activación de la ruta Ras/ERK/AP-1	49
3.2 Influencia de la DGK α en la proteólisis de CD62L	51
3.3 Contribución de la DGK α a la inducción de CD25	53
3.4 Contribución de la DGK α a la expresión de los marcadores metabólicos CD98 y CD71	54
3.5 Contribución de la DGK α a la proliferación inducida por IL-2.	55
4. Papel de la DGK α en la respuesta citotóxica	58
5. Papel de la DGK α en la respuesta antitumoral	63
6. Papel de la DGK α en la diferenciación de células T reguladoras	75
6.1 Contribución de DGK α a la diferenciación de las células T reguladoras naturales ..	75
6.2 Contribución de DGK α a la inducción de iTreg por TGF- β	78
7. Papel de la DGK α en la diferenciación de las células T CD4	81
DISCUSION	89
1. Papel de la DGK α en la regulación de la intensidad de la señal del TCR y de la IL-2 ...	91
2. Papel de la DGK α en la activación y diferenciación de las células CD8	93
3. Papel de la DGK α en la respuesta inmune y tolerancia en tumores	94
4. Papel de la DGK α en la diferenciación de las células CD4	98
5. DGK α en la regulación de la respuesta inmune.....	101
CONCLUSIONES	105
REFERENCIAS.....	109
AGRADECIMIENTOS.....	129
ANEXOS.....	133

ABREVIATURAS

AKT:	PKB
AMPc:	AMP cíclico
AP-1:	Proteína activadora 1
APC:	Célula presentadora de antígeno
BFA:	Brefeldina A
BSA:	Albúmina de suero bovino
C8-DAG:	1,2-dioctanoil- <i>sn</i> -glicerol
CD:	Grupo de diferenciación
CFSE:	Carboxifluoresceína succinimidil éster
CTL:	Linfocito T citotóxico
cDNA:	Ácido desoxirribonucleico codificante
DAG:	Diacilglicerol
DGK:	Diacilglicerol quinasa
DMSO:	Dimetilsulfóxido
DNA:	Ácido desoxirribonucleico
Dominio C1:	Dominio conservado 1
EDTA:	Ácido etilendiaminotetraacético
EGTA:	Ácido etilenglicoltetraacético
ERK:	Quinasa regulada por señales extracelulares
FBS:	Suero bovino fetal
FoxO:	del inglés <i>Forkhead box protein O</i>
FOXP3:	del inglés <i>forkhead/winged-helix protein 3</i>
GEF:	Factor intercambiador de nucleótidos de Guanina
HEPES:	Hidroxietil peperazina etanolsulfato
HGF:	Factor de crecimiento de hepatocitos
IDO:	Indolamina 2,4-dioxigenasa
IFN:	Interferón
Ig:	Inmunoglobulina
IL:	Interleuquina
IP:	Inositol-fosfato
IP₃:	Inositol-trisfosfato
iTreg:	Célula T reguladora inducida FOXP3 ⁺
JAK:	Quinasa Janus
LAT:	Proteína adaptadora del linfocito T
Lck:	Quinasa específica de linfocitos
mTOR:	del inglés <i>mammalian Target of Rapamycin</i>
MAPK:	Proteína quinasa activada por mitógenos

MARCKS:	Sustrato de quinasa C miristoilado y rico en alanina
MEK:	Quinasa de MAPK y ERK
MFI:	Intensidad media de fluorescencia
MHC:	Complejo mayor de histocompatibilidad
NFAT:	Factor nuclear de las células T activadas
NFκB:	Factor nuclear κB
NK:	Células asesinas naturales
NKT:	Células T asesinas naturales
NP-40:	Nonidet-P40
OVA:	Ovalbúmina
PA:	Ácido fosfatídico
PBS:	Tampón fosfato salino
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
PDZ:	Dominio presente en PSD-95 Discs-large y ZO-1
PI:	Fosfatidilinositol
PI(3,4)P₂:	Fosfatidilinositol-3,4-bisfosfato
PI(3,4,5)P₃:	Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato
PI(4,5)P₂:	Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato
PI3K:	Fosfatidilinositol-3 quinasa
PKB:	Proteína quinasa B (AKT)
PKC:	Proteína quinasa C
PKD:	Proteína quinasa D
PLC:	Fosfolipasa C
PMA:	Forbol-12-miristato-13-acetato
PMSF:	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PVDF:	Polifluoruro de vinilideno
R59:	R59949, 3-[2-[4-[bis(4-fluorofenil)metileno]-1-piperidinil]etil]-2,3-dihidro-2 tioxo-4(1H)-quinazolinona
RasGRP:	Proteína liberadora de nucleótidos de guanina de Ras
RNA:	Ácido ribonucleico
RT-PCR:	Reacción de transcripción inversa seguida de la reacción en cadena de la polimerasa
SDS-PAGE:	electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS
SDS:	dodecil sulfato sódico
STAT:	Transductor de señal y activador de transcripción
TACE:	Enzima convertora del Factor de necrosis tumoral α (ADAM17)
TCR:	Receptor de células T
Tcm:	Célula de memoria central

Tem: Célula de memoria efectora

TGF: Factor de crecimiento transformante

Th: Célula T *helper* (cooperadora)

TIL: Linfocito infiltrado en tumor

TLC: Cromatografía en capa fina

TNF: Factor de necrosis tumoral

Treg: Célula T reguladora

VEGF: Factor de crecimiento de endotelio vascular

WB: Western blot

WT: No modificado genéticamente (del inglés *Wild Type*), control

ZAP-70: Proteína asociada a la cadena ζ del TCR de 70 KDa

SUMMARY

Diacylglycerol kinases (DGKs) are a family of enzymes that catalyze the conversion of diacylglycerol (DAG) into phosphatidic acid (PA). Diacylglycerol kinase α (DGK α) plays an important role in the control of the immune response acting as a negative regulator of Ras-dependent pathways. DGK α expression is high in naïve T cells and it decreases upon T cell activation, whereas DGK α overexpression has been related to anergy induction. In the present work, we aimed to study the contribution of DGK α in the regulation of the intensity of the TCR signal and the subsequent impact on T cell activation, proliferation and development of the distinct T cell populations. Moreover, we studied the contribution of DGK α to tumor-induced tolerance.

We used DGK α deficient mice to analyze the contribution of this isoform as a negative regulator of TCR-triggered signals. Our data show that CD8 T cells lacking DGK α exhibit enhanced activation parameters in the absence of costimulation and both CD4 and CD8 populations display enhanced IL-2-mediated proliferation. We show that strong activation signals provided by TCR and IL-2 mediate *Dgka* transcriptional downregulation via the PI3K/AKT/FoxO axis. Whereas PI3K/AKT activation in response to costimulatory signals is essential for expansion of activated T cell populations, in CD8 T cells this axis determines cytotoxic T cell differentiation. Accordingly, we observed an enhanced cytotoxic profile in DGK α deficient mice. Our results suggest that sustained DGK α expression is important for attenuation of the signals needed for differentiation of cytotoxic T cells.

We next investigated the response of DGK α deficient cells to a tumor model that exerts tolerance by TGF- β mediated cytotoxic T cell inhibition. Our results show that, contrary to our initial hypothesis, DGK α deficiency impairs immune responses against the tumors. Analysis of tumor infiltrates reveals important alterations in both CD4 and CD8 subsets, suggesting that lack of DGK α , whereas enhancing initial T cell activation, impairs the long-term development of CD8 populations, probably as a result of altered CD4 responses.

Analysis of CD4 differentiation showed similar downregulation of *Dgka* in T CD4 effector cells whereas the levels of this enzyme increase along TGF- β mediated differentiation of induced Treg populations. As a result, CD4 Th1 phenotype is favoured in DGK α deficient CD4 T cells whereas TGF- β -mediated FOXP3 induction is impaired in DGK α ^{-/-} compared to WT mice. Our results suggest that DGK α control of Ras/MAPK activation is important for attenuation of the TCR signals needed for differentiation of CD4 populations.

Our study links DGK α to the control of signal intensity and suggests that manipulation of DGK α activity may provide opportunities in the treatment of tolerance-related immune disorders like autoimmunity or cancer.

INTRODUCCIÓN

1. LA RESPUESTA INMUNE

1.1 El sistema inmune

El sistema inmunológico tiene como función principal la protección del organismo frente a las infecciones y tumores. En esta tarea están implicados un conjunto de estructuras, células (leucocitos) y moléculas cuya correcta funcionalidad es necesaria para proporcionar una adecuada respuesta.

Al presentarse una amenaza por parte de un agente extraño, y tras alterar las barreras físicas y químicas que protegen al cuerpo frente a las infecciones, el primer mecanismo inmunológico de defensa implica la acción de las células del **sistema inmune innato**, compuesto por macrófagos, neutrófilos, granulocitos, mastocitos, células dendríticas y células NK y T $\gamma\delta$. Al mismo tiempo, pero con desarrollo más lento, se inicia la **respuesta inmune adaptativa**, en la que intervienen los linfocitos, que emplean los receptores de antígeno para reconocer a los patógenos presentados por las células presentadoras de antígeno (APCs). Esta respuesta inmune adaptativa se divide en respuesta inmune **celular**, mediada por los linfocitos T CD4 y CD8, que se ampliará en detalle más adelante, y respuesta inmune **humoral**, mediada por los linfocitos B y su diferenciación a células plasmáticas, que secretan anticuerpos específicos frente al patógeno (Murphy et al., 2008).

El conocimiento de los mecanismos de regulación de la activación y supresión de la respuesta inmune es muy importante, para así poder potenciarla en la lucha contra infecciones y tumores, o suprimirla para evitar el rechazo a transplantes.

1.2 La respuesta inmune adaptativa

La respuesta inmune adaptativa se desarrolla en tres etapas diferentes. La fase inicial o de **expansión** se desarrolla en el tejido linfoide, donde los linfocitos sin activar (*naïve*) reconocen antígenos extraños mediante la formación de conjugados estables con las APCs. En respuesta al reconocimiento de antígenos, los linfocitos se expanden clonalmente, secretan citoquinas y diferencian a **células efectoras**. Las citoquinas son proteínas pequeñas liberadas al medio tras la activación de las células, que determinan el tipo de respuesta efectora. Las citoquinas secretadas por los linfocitos T CD4 y CD8 efectores contribuyen a eliminar las células infectadas y reclutan células del sistema inmune innato. Como resultado se produce una respuesta **inflamatoria aguda** cuyo propósito es erradicar al agente extraño (Murphy et al., 2008).

En las semanas siguientes a la respuesta inicial, el 90% de las células T efectoras mueren por apoptosis en la llamada fase de **contracción**. Las células que no se eliminan por este mecanismo diferencian a células de **memoria**, pudiendo sobrevivir durante largos periodos en ausencia de antígeno (Obar et al., 2010). En comparación a las células sin activar, las células de

memoria responden de manera más rápida y con mayor intensidad frente a la estimulación antigénica, por lo que pueden dar lugar a una mejor respuesta frente a una segunda infección por el mismo agente extraño (Ahmed and Gray, 1996).

2. TOLERANCIA Y AUTOINMUNIDAD

La respuesta inmune efectora tiene que estar muy regulada para poder discernir entre lo propio y lo ajeno, facilitando así la eliminación de los agentes extraños. El conjunto de procesos encargados de que este fenómeno suceda constituyen la **tolerancia**, que actúa tanto en linfocitos T como en linfocitos B. Los mecanismos de tolerancia T se ejercen en el timo durante la maduración de los linfocitos T (tolerancia central) y en la periferia.

Estos mecanismos también tienen que estar estrictamente regulados, ya que los defectos en su control se traducen en la aparición de enfermedades autoinmunes. Además, debido a la existencia de la tolerancia se produce el fenómeno de evasión de la respuesta inmune tumoral, por lo que la posibilidad de su supresión es importante.

2.1 Tolerancia central

En el timo tiene lugar la maduración de los linfocitos T y su “aprendizaje”, que les permite discriminar entre lo propio y lo extraño. Los linfocitos reconocen a través de su receptor de antígeno (TCR) el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) unido a péptidos propios, presentados por las células epiteliales del timo. La formación de complejos de baja afinidad con antígenos propios da lugar al proceso de selección positiva; mientras que la formación de complejos de alta afinidad se traduce en una señal fuerte a través del TCR, induciendo la muerte celular en lo que se conoce como selección negativa. Sin embargo, a veces este mecanismo no es suficiente, y algunas células que potencialmente podrían ser autorreactivas escapan a la periferia, donde existen los mecanismos de tolerancia periférica (Mak et al., 2008; Stockinger, 1999).

2.2 Tolerancia periférica

Existen diferentes mecanismos de generación de tolerancia en la periferia, bien mediados por las APCs o por las propias células T.

A. Tolerización mediada por células dendríticas en células T sin activar

Las células dendríticas inmaduras que permanecen en la periferia están en contacto continuo con antígenos del entorno. En ausencia de agentes extraños, sólo encuentran antígenos propios, y al encontrarse con una célula T *naïve* que ha escapado a los mecanismos de tolerancia central, la célula dendrítica actúa de una manera tolerogénica de dos maneras: induciendo

delección clonal o **anergia**. En la **delección clonal**, la célula dendrítica activa mecanismos que inducen apoptosis de la célula T. En la **anergia**, la célula T sobrevive pero se mantiene en un estado inactivo que no le permite diferenciar a efectora (Mak et al., 2008).

B. Tolerización en células T activadas

Existen dos mecanismos principales de control de la aparición de una respuesta inmune excesiva en células T activadas. Uno de ellos es el **agotamiento clonal**, en el que la exposición continua al antígeno fuerza a una continua proliferación de las células T efectoras, que terminan muriendo sin llegar a producir células de memoria (Fuller and Zajac, 2003). Otro mecanismo es el **control de la respuesta efectora por las células T reguladoras**.

2.3 Control de la respuesta adaptativa por las células T reguladoras

Las células T reguladoras (Treg) son un subtipo de células T CD4 que suprimen la activación de las células del sistema inmune, evitando una respuesta inflamatoria excesiva. La primera evidencia de autoinmunidad por deficiencia de Treg se encontró en los ratones *scurfy*, que desarrollan una enfermedad linfoproliferativa debido a la existencia de una mutación espontánea ligada al cromosoma X, descrita por primera vez en 1959 (Russell et al., 1959). En el 2001 se asignó la mutación al gen FOXP3 (Brunkow et al., 2001; Wildin et al., 2001), descrito también para los pacientes que sufren de IPEX (Inmunodeficiencia con Poliendocrinopatía y Enteropatía, ligado al cromosoma X) (Bennett et al., 2001). Los ratones deficientes para FOXP3 desarrollan un síndrome linfoproliferativo autoinmune (Brunkow et al., 2001) que causa la muerte a las 3-4 semanas de edad debido a una deficiencia en células Treg (Fontenot et al., 2003) con producción excesiva de citoquinas T *helper* (T cooperadora, Th) 1 y Th2 (Kanangat et al., 1996). Igualmente, al eliminar las células FOXP3⁺ de ratones normales se desarrolla una enfermedad linfoproliferativa que conduce a su muerte en 2 semanas (Kim et al., 2007a).

Las poblaciones Treg naturales se diferencian en el timo aunque también se ha descrito la aparición de poblaciones reguladoras inducidas en la periferia. Las Treg naturales CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ se desarrollan en el timo a partir de linfocitos T CD4 que expresan un TCR de alta afinidad para el complejo MHC de tipo II. Esta señal es necesaria para la inducción de la expresión de FOXP3 (Bensinger et al., 2001; Jordan et al., 2001) y es dependiente de la señalización por CD28, de citoquinas que señalizan por receptores que comparten la cadena gamma común (γc) y de otros factores no identificados (Tai et al., 2005; Vang et al., 2008).

Las Treg son capaces de suprimir la respuesta de varios tipos celulares, incluyendo células B, NK, NKT, T CD4 y CD8, monocitos y células dendríticas, aunque la respuesta supresora más conocida es la que ejercen sobre las células T CD4. Su principal función es la supresión de la activación y expansión de las células CD4 *naïve*, pero también pueden inhibir a

las CD4 efectoras y de memoria (Levings et al., 2001). Para ser activadas por el TCR, las Treg necesitan la presencia de la Interleuquina (IL)-2 (Thornton and Shevach, 1998), mientras que la coestimulación es dispensable (Takahashi et al., 2000). No secretan IL-2, por este motivo consumen la IL-2 de las células T efectoras .

Existen diferentes mecanismos de supresión por parte de las Treg. Tras el contacto con la célula diana, las Treg inhiben la proliferación y producción de la IL-2 (Thornton and Shevach, 1998), induciendo un fenotipo anérgico a las células diana (Ermann et al., 2001). La molécula inhibidora CTLA-4 se expresa constitutivamente en la superficie de las Treg y es utilizada para ejercer su supresión (Takahashi et al., 2000). Su papel *in vivo* es importante, ya que su deficiencia o bloqueo resulta en autoinmunidad espontánea (Bachmann et al., 1999). Entre los mecanismos más importantes de supresión por CTLA-4 destacan la bajada en la expresión de las moléculas coestimuladoras CD80 (B7.1) y CD86 (B7.2) en las células dendríticas (Oderup et al., 2006), así como su estimulación para que expresen la enzima Indolamina 2,4-dioxigenasa (IDO), encargada de convertir el triptófano en quinurenina, tóxica para las células T que permanezcan en los alrededores de las células dendríticas (Grohmann et al., 2002).

Otro mecanismo importante de supresión dependiente de contacto es la hidrólisis del ATP extracelular a ADP por medio de la ectoenzima CD39 (nucleosido trifosfato difosfohidrolasa-1, NTPDasa1) expresada en las Treg (Borsellino et al., 2007). La adenosina señala por el receptor de adenosina A2A y puede inhibir a las células dendríticas además de a las células T activadas, mediante la elevación del AMP cíclico (AMPc) (Ernst et al., 2010). Las Treg producen altos niveles de AMPc, que media la supresión de las CD4 tras su contacto con las Treg, posiblemente por su transferencia hacia las CD4 a través de uniones intercelulares. Si se inhibe la formación de estas uniones, se anula parte de la supresión de la proliferación y la producción de IL-2 ejercidas (Bopp et al., 2007). Asimismo, las Treg reducen la activación de las células T CD4 mediante la inhibición del contacto entre la célula *naïve* CD4 y las dendríticas (Tadokoro et al., 2006)

Además de mecanismos de supresión dependientes de contacto, las Treg ejercen supresión mediante la secreción de citoquinas inmunoregulatoras, como son la IL-10 y el TGF- β (Nakamura et al., 2001), e inducen que las células dendríticas tolerogénicas secreten IL-10. Existe además una población de células Treg que secreta IL-10 pero no expresa FOXP3, denominada Tr1 (Roncarolo et al., 2006).

Las Treg pueden producir altas concentraciones de TGF- β soluble y unido a membrana, que inhibe la proliferación de las T CD4 (Nakamura et al., 2001). Además, las células CD4 de los ratones transgénicos que expresan un mutante dominante negativo del TGF- β RII muestran resistencia a la supresión por parte de las Treg *in vivo* (Fahlen et al., 2005), sugiriendo que el TGF- β producido por las Treg forma parte de su mecanismo de control de la respuesta inmune.

3. TOLERANCIA, RESPUESTA INMUNE Y CÁNCER

Durante la vida del individuo, sus células se dividen, diferencian y mueren de una manera controlada, debido a la existencia de mecanismos de regulación que mantienen un equilibrio entre proliferación y diferenciación celular.

Las células de un tejido que se dividen sin control generan una masa denominada **tumor**. Sin embargo, no todos los tumores degeneran en cáncer, sólo aquellos que contienen células poco diferenciadas, crecen agresivamente, no están encapsulados, y son invasivos son los considerados **malignos**. Las células de estos tumores viajan a través del sistema circulatorio hacia otras localizaciones diferentes a la inicial, generando metástasis que pueden comprometer la salud del individuo. Durante el proceso de **malignización** se acumulan mutaciones en los genes que controlan la reparación del DNA, la proliferación y la muerte celular programada, resultando en un crecimiento celular no controlado (Hanahan and Weinberg, 2011). Esas mutaciones pueden ser causadas por **carcinógenos**, pero también se atribuye gran importancia a la existencia de un **entorno inflamatorio crónico** (David, 1988), ya que las citoquinas inflamatorias facilitan que las células mutadas sobrevivan y proliferen.

El sistema inmune puede luchar frente al cáncer de diversas maneras, primariamente eliminando las infecciones que provocan un entorno inflamatorio crónico y con ello la tumorogénesis. En algunos casos, los linfocitos pueden identificar y responder frente a células tumorales a partir del reconocimiento de los antígenos específicos del tumor, en un proceso denominado **inmunovigilancia**. Sin embargo, la mayoría de los tumores en estadios más avanzados escapan de la respuesta inmune, induciendo un estado de tolerancia frente al tumor. Los mecanismos de tolerancia inmunológica en este caso pueden favorecer el desarrollo de tumores, ya que las células tumorales son poco inmunogénicas. La evasión de la respuesta inmune por mecanismos de tolerancia impide la eliminación de células tumorales residuales, que pueden sobrevivir durante varios años y producir recidivas en diferentes órganos, aumentando su capacidad metastática, su potencial invasivo y su resistencia a la quimioterapia.

La respuesta inmune frente a los tumores consta de tres fases: **eliminación**, **equilibrio** y **escape**. En la fase de **eliminación**, los sistemas inmune innato y adaptativo funcionan en conjunto para atacar el tumor, incluso antes de que éste sea detectado clínicamente. En esta fase se desencadena un proceso de **inflamación aguda**, en la que se reclutan macrófagos, neutrófilos y eosinófilos que secretan Interferón- γ (IFN- γ), IL-12 y Factor de Necrosis Tumoral (TNF). El IFN- γ y la IL-12 promueven respuestas T CD4 Th1 y NK, y respuesta CD8 citotóxica (CTL) frente a las células del tumor. Además, estas citoquinas tienen efecto antiangiogénico. El TNF induce directamente necrosis de las células tumorales. Las células NKT también secretan IFN- γ , que estimula la acción antitumoral de las células NK, y lleva también a la secreción de IFN- γ por parte de éstas. Las células T CD4 infiltradas con fenotipo Th1 y las CTL estimulan a su vez a neutrófilos, eosinófilos, macrófagos y NK (Kim et al., 2007b).

Si tiene éxito, esta fase permite la eliminación completa del tumor. Si por el contrario, el tumor no se elimina, se entra en una fase de **equilibrio**, en la que las células del sistema inmune adaptativo contienen el crecimiento del tumor. La fase de equilibrio puede prolongarse durante toda la vida del individuo y así mantener oculta la presencia de las células malignas. Durante esta fase, se activan mecanismos de **inmuno-edición** que permiten al tumor tolerizar el sistema inmune, lo que finalmente favorece la fase de **evasión**, en la que el sistema inmune ya no puede contener al tumor. Las variantes tumorales generadas durante este proceso pueden no ser reconocidas por las células de la inmunidad adaptativa (por pérdida de antígenos tumorales o con defectos en presentación antigénica), volverse insensibles a los mecanismos efectores del sistema inmune, o inducir inmunosupresión en el microambiente del tumor (Schreiber et al., 2011) por la secreción de dos potentes inmunosupresores, que son el TGF- β y la IL-10, contribuyendo a este proceso de tolerización. El TGF- β inhibe la funcionalidad de las CTLs (Thomas and Massague, 2005) y contribuye a la generación de poblaciones Treg.

4. CONTROL DE LA ACTIVACIÓN O TOLERANCIA DE LOS LINFOCITOS T

4.1 La activación de los linfocitos T

La activación de los linfocitos T periféricos es un fenómeno muy importante para su diferenciación a células efectoras. Este proceso requiere tanto del reconocimiento del antígeno específico por parte del TCR como de la presencia de señales coestimuladoras presentadas por las APCs. Tras este fenómeno se desencadena una cascada de señalización iniciada por la activación de tirosina quinasas de la familia Src (Lck, Fyn), ZAP-70 (Proteína asociada a la cadena ζ del TCR de 70 KDa) y miembros de la familia Tec quinasa. Lck fosforila los motivos ITAM de CD3 y de la cadena ζ del TCR, lo que permite la interacción con ZAP-70, que fosforila a la proteína adaptadora del linfocito T (LAT). La fosforilación de LAT proporciona sitios de unión para proteínas implicadas en señalización por TCR, como SHC-Grb2-SOS, Fosfatidil inositol 3 quinasa (PI3K) y Fosfolipasa C γ (PLC γ). La enzima PLC γ hidroliza el Fosfatidil-inositol-4,5-bisfosfato (PIP₂) en Inositol-1,4,5-trisfosfato (IP₃) y Diacilglicerol (DAG). El IP₃ generado estimula los canales de Ca²⁺ IP3R de la membrana del retículo endoplásmico, llevando a un incremento del flujo de Ca²⁺ en la célula, determinante en la activación del factor de transcripción NFAT (Smith-Garvin et al., 2009). El DAG generado durante la estimulación antigénica permite la localización y activación de proteínas señalizadoras que incluyen las PKCs α y θ , PKD, RasGRP1 y β -Quimerina (Carrasco and Merida, 2004; Siliceo et al., 2006) (**Fig 1**).

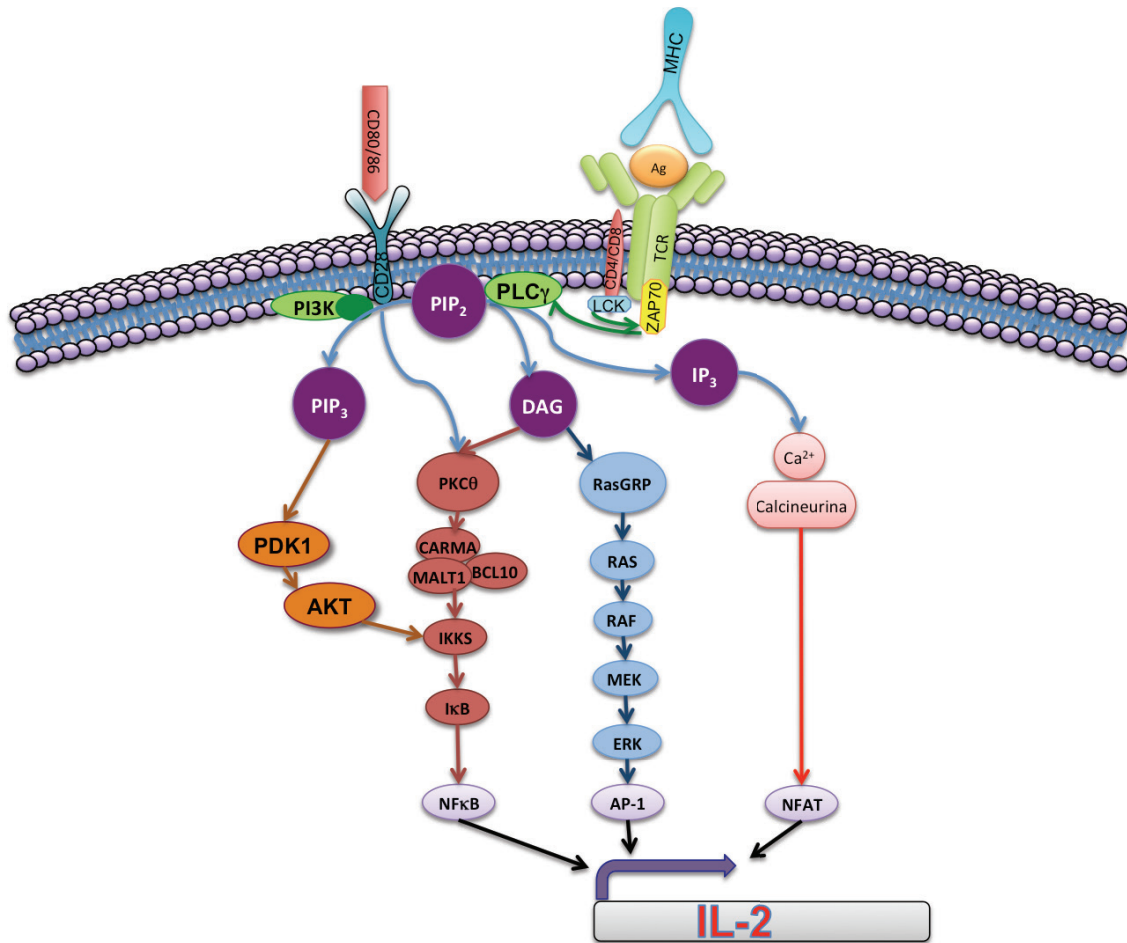


Figura 1. Principales rutas de señalización por lípidos que contribuyen al programa transcripcional de activación de las células T. Tras la estimulación por el TCR y el reconocimiento del antígeno (Ag) presentado a través del MHC por las APCs, se desencadena una cascada de señalización mediada por fosforilaciones que activa la PLC γ , generando DAG e IP $_3$. La señal coestimuladora contribuye a la activación de PKC θ y PI3K. La combinación de estas señales favorece el reclutamiento de los factores de transcripción NFAT, AP-1 y NF- κ B, que en último término dan lugar a la síntesis de IL-2 y de la cadena α de su receptor.

RasGRP1 es un factor intercambiador de nucleótidos de Guanina (GEF), que traduce el aumento de los niveles de DAG producidos tras la estimulación antigénica en la transformación de RasGDP a su forma activa RasGTP que, a su vez, inicia la cascada de fosforilaciones de la ruta de MAPK (proteína quinasa activada por mitógenos), culminando en la fosforilación y activación de la quinasa extracelular regulada por señal (ERK) 1 y 2. ERK activa el factor de transcripción Elk1, que contribuye a la activación del factor de transcripción AP-1 (Proteína Activadora-1, Jun/Fos) mediante la regulación de la expresión de Fos (Genot and Cantrell, 2000) (Fig 1).

La señalización por el TCR se traduce en la activación de los factores de transcripción AP-1 y NFAT. Estas señales, aunque necesarias, no son suficientes para la transcripción del gen de la IL-2 y de su receptor de alta afinidad, cuya expresión permite la expansión clonal y posterior diferenciación de los linfocitos T. La activación de receptores coestimuladores como el CD28 por su ligando B.7 permite la activación de la PKC θ , regulando la activación del factor

de transcripción NF- κ B. Tras la unión del CD28 a sus ligandos CD80 o CD86 en las APCs, la subunidad reguladora p85 de la PI3K se asocia con los motivos citoplásmicos de CD28. Esta subunidad lleva asociada la subunidad catalítica p110, que convierte el PIP₂ en PIP₃ en la membrana. El PIP₃ generado interviene en la activación de AKT (Proteína quinasa B, PKB), que facilita la translocación del factor de transcripción NF- κ B al núcleo, el cual tiene efectos positivos en la expresión de genes relacionados con la supervivencia (Smith-Garvin et al., 2009). La activación conjunta de las rutas de AP-1, NFAT y NF- κ B promueve que estos factores de transcripción se unan de forma coordinada la región promotora del gen de la IL-2 (Fig 1).

4.2 La anergia en linfocitos T

Cuando una célula T reconoce a un antígeno específico en ausencia de coestimulación a través del CD28, o bien la coestimulación se realiza a través del receptor inhibitorio CTLA-4, no se generan suficientes niveles de IL-2 y la célula T entra en un proceso de no respuesta denominado anergia (Greenwald et al., 2001; Krummel and Allison, 1996; Wells et al., 2001). La anergia responde a un programa transcripcional regulado por NFAT, al favorecerse las rutas reguladas por Ca²⁺ frente a las que regula el DAG. Este fenómeno se correlaciona con un patrón de alta expresión de genes específicos implicados en la regulación negativa de la activación de las células T, como son *Dgka* (Diacilglicerol quinasa alfa) (Macian et al., 2002) y *Cblb*. La proteína Cbl-b posee actividad ubiquitin-ligasa y regula la fosforilación de PLC γ , y con ello su actividad en células anérgicas (Jeon et al., 2004). Además, regula el reclutamiento de la subunidad p85 de la PI3K al CD28 y a la cadena ζ del TCR, controlando la señal de activación de las células T (Fang and Liu, 2001).

5. LAS DIACILGLICEROL QUINASAS EN EL CONTROL DE LA TOLERANCIA Y LA ACTIVACIÓN DE LAS CÉLULAS T

Las Diacilglicerol Quinasas (DGK) catalizan la fosforilación del DAG dando lugar a su conversión a ácido fosfatídico (PA), modulando así los niveles de dos lípidos con importantes funciones como segundos mensajeros intracelulares (Cai et al., 2009; Merida et al., 2008) (Fig 2). Existen diez isoformas de DGKs en mamíferos, que se agrupan en 5 subtipos atendiendo a la presencia de diferentes motivos reguladores en su secuencia. Todas las DGKs poseen un dominio catalítico conservado (Raben and Wattenberg, 2009) y al menos dos dominios C1 ricos en cisteína, pero que sólo en algunas isoformas contienen los residuos necesarios de unión a DAG. La caracterización de los dominios reguladores no conservados de las DGKs ha

permitido ampliar el conocimiento sobre la regulación de la funcionalidad de las diferentes isoformas de DGK (Sakane et al., 2007; Topham and Epand, 2009) (Fig 3).

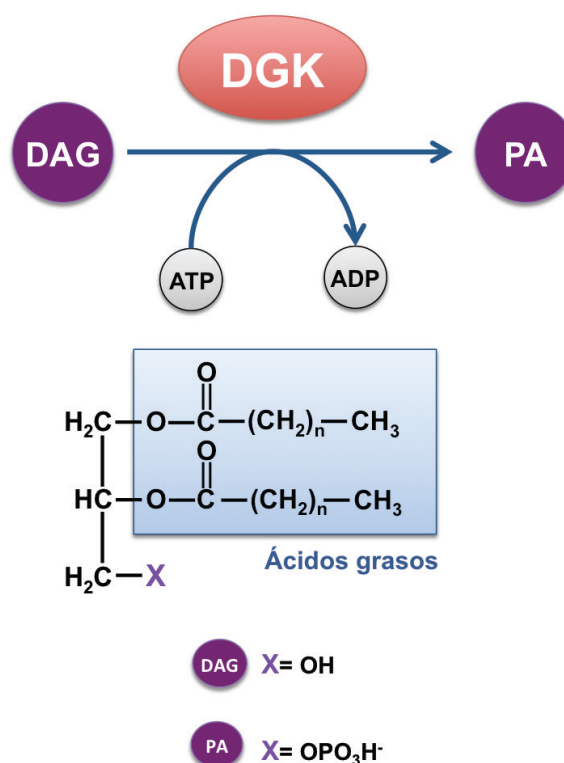


Figura 2. Reacción catalizada por las DGKs.

5.1 Diacilglicerol quinzasas en linfocitos

Las dos principales DGKs expresadas en linfocitos T son DGK α y DGK ζ . DGK α es una DGK de tipo I que se expresa abundantemente en el citosol de los linfocitos T y transloca a la membrana durante su activación (Sanjuan et al., 2003). Su actividad parece tener un efecto negativo en su estabilización en la membrana, ya que un mutante sin actividad transloca de forma mucho más sostenida (Merino et al., 2007). La activación de la DGK α inhibe la activación de Ras, mediada por la localización a la membrana de RasGRP1 (Jones, 2002; Sanjuan et al., 2003). El dominio N terminal de DGK α contiene un dominio tipo recoverina y un tándem de dominios característicos de unión a Ca^{2+} , que actúan como reguladores negativos de su activación (Jiang et al., 2000a) (Fig 3).

Los linfocitos sin activar poseen altos niveles de expresión de DGK α , reduciéndose drásticamente tras la activación linfocitaria (Sanjuan et al., 2003). La activación del TCR induce la fosforilación en tirosina de la DGK α endógena por un mecanismo dependiente de Lck. Dicha fosforilación es facilitada por el Ca^{2+} generado por la PLC γ , garantizando así la correcta activación de PLC γ y DGK α en el tiempo (Merino et al., 2008).

La fosforilación de DGK α en tirosina no es específica de linfocitos T, ya que otros autores han descrito su activación y fosforilación en otros tipos celulares. En células endoteliales y epiteliales DGK α se activa por diversos factores de crecimiento, como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y el factor de crecimiento hepático (HGF). En estas células, el PA producido por la DGK α se ha implicado en la regulación de la migración y proliferación celular, mediado por su fosforilación por la quinasa Src (Bacchiocchi et al., 2005; Baldanzi et al., 2008; Cutrupi et al., 2000). En células tumorales la generación de PA por DGK α es importante para regular el reciclaje de integrinas, facilitando la invasión y generación de metástasis (Rainero et al., 2012).

TIPO

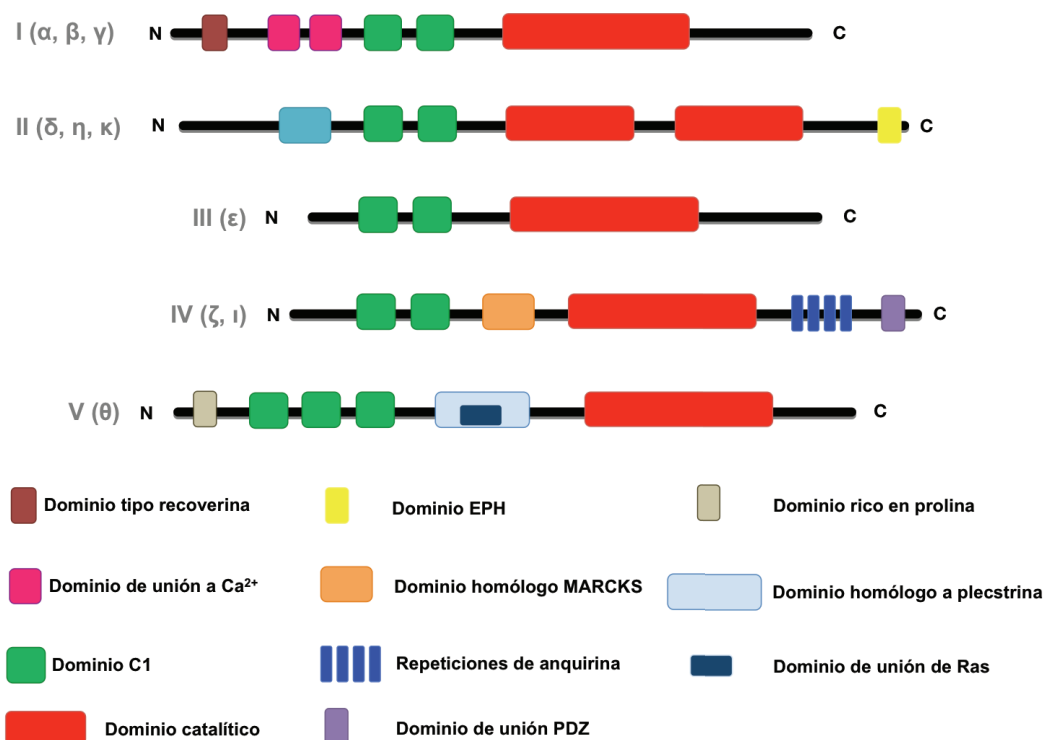


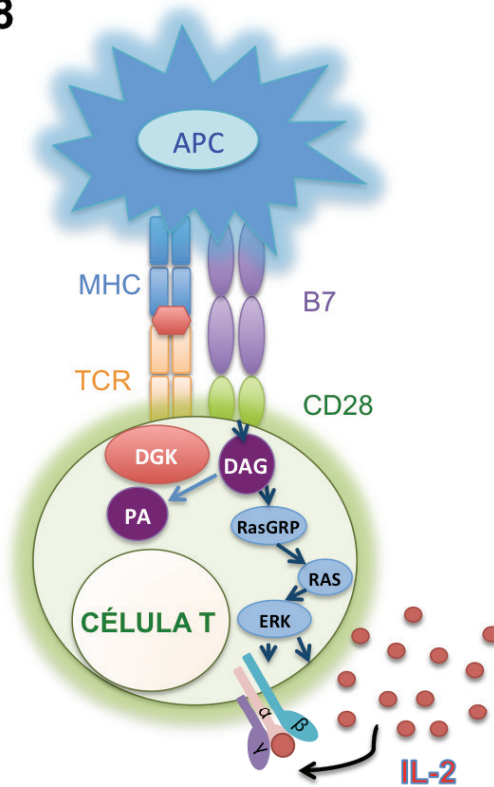
Figura 3. Clasificación de las DGKs en mamíferos. La familia de las DGKs está formada por diez isoformas, clasificadas en 5 grupos diferentes. Modificado de (Merida et al., 2008).

Al identificar *Dgka* como uno de los genes inducidos en anergia (Macian et al., 2002), se pone de manifiesto la importancia de la regulación del equilibrio entre las señales reguladas por Ca²⁺ y DAG en el control de la tolerancia. A diferencia de la mayoría de los genes relacionados con la inducción de anergia, *Dgka* no es regulado por el factor de transcripción NFAT (Soto-Nieves et al., 2009).

Experimentos en ratones deficientes para DGK α han confirmado la función de esta enzima en la inducción de anergia. La sobreexpresión de DGK α en linfocitos los conduce a un estado anérgico en el que no responden al estímulo (Zha et al., 2006). Las células T de los ratones deficientes en DGK α presentan niveles aumentados de RasGTP, mayor activación de

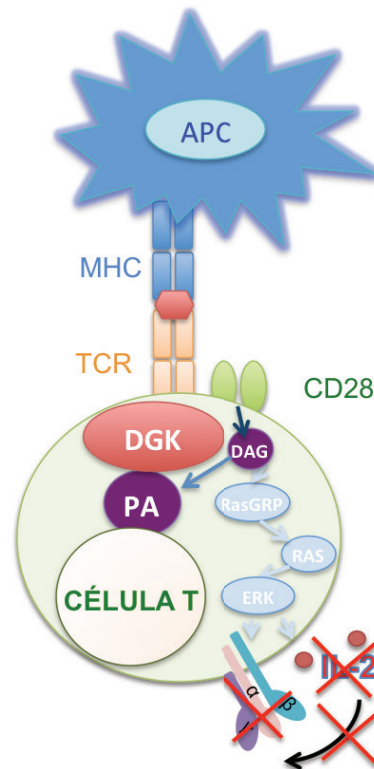
MAPK en respuesta a la activación antigénica, y son resistentes a la inducción de anergia (Olenchok et al., 2006) (**Fig 4**).

TCR + CD28



PROLIFERACION

TCR



ANERGIA

Figura 4. DGKs y anergia. La estimulación de las células T por las APCs en presencia de coestimulación por CD28 limita la función de las DGKs y permite una activación correcta de la ruta de Ras, dando lugar a una adecuada producción de IL-2 y la proliferación de la célula T. Si la estimulación se produce en ausencia de coestimulación o se activan moléculas coestimuladoras inhibitorias (CTLA-4, no mostrado) aumenta la expresión de las DGKs, que consumen más DAG, limitando la activación de Ras, por lo que no se sintetiza la suficiente IL-2 para que la célula prolifere. Modificado de (Mueller, 2006).

Los linfocitos T además expresan la DGK de tipo IV DGK ζ , que posee un patrón de expresión más ubicua (Ding et al., 1998). En cuanto a su estructura, DGK ζ posee un dominio tipo MARCKS que se fosforila por PKCs (Santos et al., 2002), y posee dominios PDZ y repeticiones de anquirina que le permiten interactuar con otras proteínas (Rincon et al., 2012) (**Fig 3**). Una de las proteínas con las que interactúa en linfocitos es la SNX-27, implicada en la regulación del tráfico vesicular (Rincon et al., 2007).

DGK ζ también regula la activación de la ruta Ras-MAPK metabolizando el DAG que se genera durante la señalización por antígeno (Gharbi et al., 2013; Gharbi et al., 2011). Los ratones deficientes para esta enzima, como los deficientes para la DGK α , presentan niveles de fosforilación de MAPK y de RasGTP aumentados tras la estimulación del TCR, junto con

mayor proliferación, respuesta frente a virus incrementada (Zhong et al., 2003) y resistencia a la inducción de anergia (Olenchok et al., 2006).

Ambas isoformas de DGK (α y ζ) parecen poseer funciones redundantes en la regulación de la activación de linfocitos en periferia, y particularmente durante la diferenciación tímica. El fenotipo de diferenciación tímica es normal en ratones deficientes para cada isoforma, mientras que los ratones deficientes para ambas presentan un importante defecto en selección tímica con pocas células simples positivas CD4 y CD8 e hiperactivación de la ruta de Ras (Guo et al., 2008).

6. PAPEL DE LA IL-2 EN LA ACTIVACIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE LOS LINFOCITOS T

Las células T *naïve* tras activarse entran en ciclo celular, se dividen y se diferencian hacia poblaciones T efectoras. Para poder conseguirlo, necesitan de la acción de la IL-2. La IL-2 es una citoquina de 15,5 KDa, descubierta en 1976 en sobrenadantes de células T activadas (Morgan et al., 1976). Producida primariamente por las células CD4 tras su activación por antígeno, es importante para la proliferación, actividad citolítica, supervivencia y diferenciación de las células T. Además, el control de la intensidad de las señales de IL-2 es muy importante para la generación de células de memoria, y su reconocimiento por las células Treg es definitiva para su acción supresora .

6.1 Regulación de la expresión de la IL-2 y su receptor

El receptor de IL-2 (IL2R) está compuesto por tres cadenas con diferente afinidad por la IL-2, que se asocian para formar dos tipos de receptores: el de alta y el de baja-intermedia afinidad (Taniguchi and Minami, 1993). El receptor dimérico de baja-intermedia afinidad se expresa principalmente en células de memoria y NK, está formado por la subunidad β (CD122) y la cadena γ_c de los receptores de interleuquina (CD132). CD122 forma parte también del receptor de interleuquina 15, mientras que CD132 forma parte de los receptores de IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 e IL-21. Ya que su afinidad por IL-2 no es alta, este receptor necesita ser expresado a altos niveles para poder responder eficazmente (Kim et al., 2006). La señalización tras la unión de IL-2 a este receptor se realiza a través de la heterodimerización de sus dominios citoplásmicos (Nakamura et al., 1994; Nelson et al., 1994), dando lugar a la activación de varias vías de señalización importantes: PI3K/AKT, Ras-MAPK, y JAK-STAT (Quinasa Janus-Transductor de señal y activador de transcripción) . Estas vías de señalización están implicadas en el crecimiento y supervivencia celular, diferenciación y muerte celular inducida por activación (AICD) (Boyman and Sprent, 2012; Friedmann et al., 1996). (Fig 5).

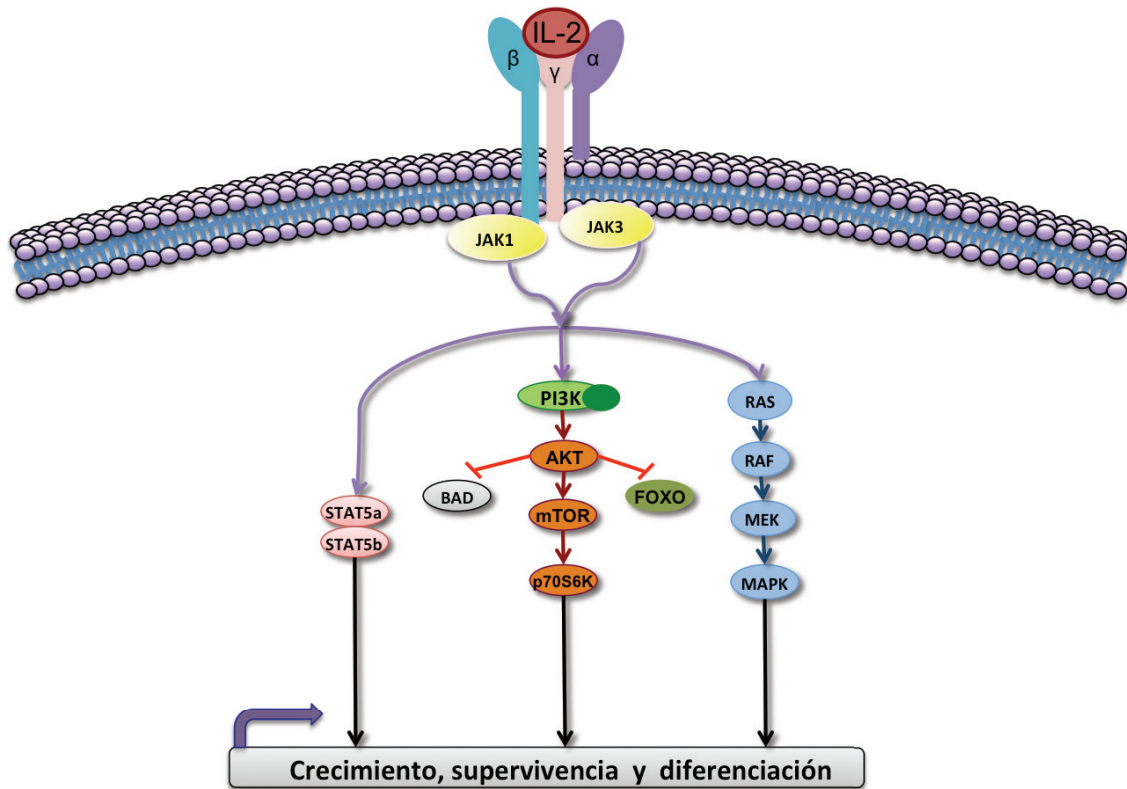


Figura 5. Señalización por la IL-2 en células T. La señalización por la IL-2 en las células T implica la activación de varias rutas de señalización, incluyendo la ruta de JAK-STAT, PI3K, y MAPK junto con la inhibición de rutas proapoptóticas, dando lugar al incremento en la transcripción de genes implicados en el crecimiento celular, supervivencia y diferenciación. Modificado de (Boyman and Sprent, 2012).

El receptor trimérico de alta afinidad está compuesto del receptor anteriormente mencionado junto con la cadena α (CD25). CD25 no posee función señalizadora, sino que aumenta la afinidad del receptor por su ligando de 10 a 100 veces. La IL-2 inicialmente se une a la subunidad α , luego la subunidad β es reclutada y finalmente la cadena γ c (Stauber et al., 2006; Wang et al., 2005). Las células T que no se están dividiendo expresan el receptor dimérico, por lo que sólo responden a altas concentraciones de IL-2. La señal del TCR junto con las señales coestimuladoras inducen la expresión de CD25, dando lugar a un receptor con mayor afinidad por la IL-2, permitiendo así que las células respondan a concentraciones bajas de IL-2. La unión de IL-2 a su receptor permite la progresión a lo largo del ciclo celular, ejerciendo como factor de supervivencia, y promoviendo la diferenciación a distintas poblaciones efectoras (Fig 5). Tras la unión de la IL-2 al receptor trimérico, el complejo IL-2-IL2R es internalizado y degradado, mientras que CD25 puede ser reciclado a la superficie celular. La expresión de CD25 por las células T además se regula por la propia IL-2 mediante la unión de STAT5 al locus de *Cd25* (Nakajima et al., 1997), dando lugar a una retroalimentación positiva.

6.2 IL-2 y la diferenciación de las células T CD8

El TCR de los linfocitos CD8 reconoce antígenos que son presentados por MHC de tipo I. Tras la activación inicial, aumentan su expresión de la glicoproteína CD44, importante en la migración de los linfocitos a las zonas de inflamación (Borland et al., 1998), expanden y se diferencian a CTLs efectores, especializados en la defensa frente a patógenos intracelulares (**Fig 6**). Los CTLs establecen contacto con las células infectadas, y secretan citoquinas como IFN- γ y TNF. Además, secretan gránulos citotóxicos que contienen perforina y granzimas, dando lugar a la lisis de las células diana. Estos mecanismos son dependientes de la señalización por Ca^{2+} , mientras que la expresión de Fas-ligando, que desencadena el proceso de apoptosis en las células diana, es independiente de Ca^{2+} (Barry and Bleackley, 2002).

La secreción de IL-2 es esencial para la expansión de las CTLs, ya que se ha demostrado en los ratones deficientes para IL-2 y para CD25 que la expansión primaria de las CTLs tras la infección por virus se reduce, llevando a una peor eliminación del virus (Cousens et al., 1995; Obar et al., 2010).

Los mecanismos que dan lugar a la generación de poblaciones de CTLs efectores o de memoria son complejos y vienen determinados por el encuentro inicial con el antígeno y la señal recibida de la IL-2. Si la estimulación inicial recibida por el TCR es completa y breve, se genera una población CTL efectora capaz de dar lugar posteriormente a poblaciones de memoria (Kaech and Ahmed, 2001; Mercado et al., 2000; van Stipdonk et al., 2001). Tras la estimulación del TCR, una pequeña población de células CD8 aumenta su expresión de CD25 por las señales de IL-2, pero disminuye de manera temprana. Esta población será la que aumente su expresión del receptor de IL-7 (CD127) y CD62L (L-selectina) y pueda sobrevivir a la fase de contracción. Sin embargo, las células que expresen alto nivel de CD25 en la expansión primaria recibirán señales fuertes de IL-2 durante un periodo largo de tiempo, llevándolas a un fenotipo efector que morirá por apoptosis en la fase de contracción (Kalia et al., 2010; Pipkin et al., 2010). Las poblaciones de memoria generadas son diferenciadas en dos subtipos diferentes en función de su expresión de CD62L, dividiéndose en células de memoria central (Tcm, $\text{CD62L}^+\text{CD127}^+$) y células de memoria efectora (Tem, $\text{CD62L}^-\text{CD127}^+$), con distintas funciones en la respuesta secundaria a infecciones (Bachmann et al., 2005) (**Fig 6**).

Además de la IL-2, la señal de la IL-15 interviene también en la generación de las poblaciones de memoria. Aunque IL-2 e IL-15 señalizan a través de la cadena β del receptor de IL-2, tienen efectos diferentes. La señalización vía IL-2 favorece la generación de una población efectora frente a una de memoria, mientras que la señalización por IL-15 promueve el efecto contrario (Carrio et al., 2004; Weninger et al., 2001).

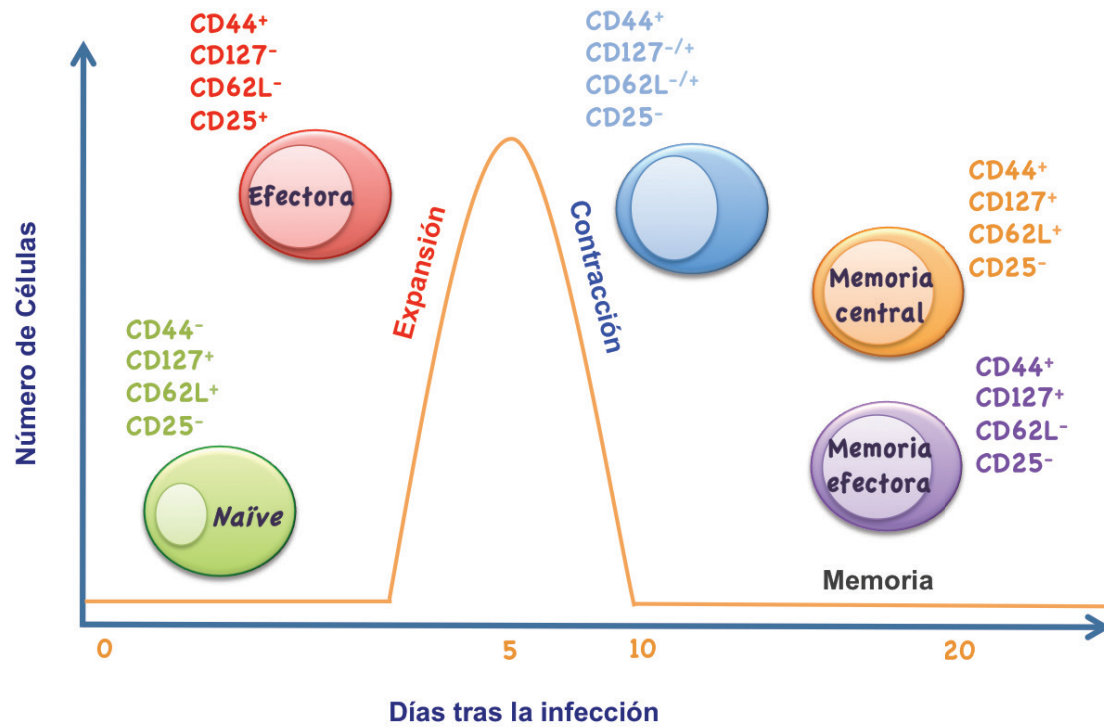


Figura 6. Fases de la respuesta efectora y generación de memoria. Expresión de marcadores de superficie y número de células en función del tiempo desde la aparición del agente extraño. Modificado de (Boyman and Sprent, 2012)

6.3 IL-2 y la diferenciación de las células T CD4

Tras el encuentro e interacción con el antígeno presentado por las APCs en el contexto del MHC de tipo II, las células CD4 pueden diferenciarse a diferentes linajes de células efectoras Th o Treg inducidas. Su diferenciación hacia un linaje u otro depende de la intensidad de la estimulación recibida a través de su TCR y de las citoquinas del entorno (Boyton and Altmann, 2002) (**Fig 7**).

Existen tres tipos de células Th en virtud de la activación de diferentes programas transcripcionales. Los linfocitos **Th1** secretan IFN- γ y actúan principalmente en la defensa frente a patógenos intracelulares. Su inducción es mediada por la síntesis de IL-12 por las células del sistema inmune innato, y el IFN- γ producido por las células NK y T. La IL-12 induce la expresión de T-bet (Ylikoski et al., 2005), que actúa como el factor de transcripción maestro de la respuesta Th1 (Szabo et al., 2000). T-bet promueve la síntesis de IFN- γ , del receptor de IL-12 (Hatton et al., 2006; Mullen et al., 2001) e inhibe la actividad del factor de transcripción GATA3, que regula la expresión de las citoquinas que favorecen la diferenciación a Th2 (Hwang et al., 2005b). La IL-12 también activa el factor de transcripción STAT4, que aumenta la expresión de IFN- γ (Chang and Aune, 2005).

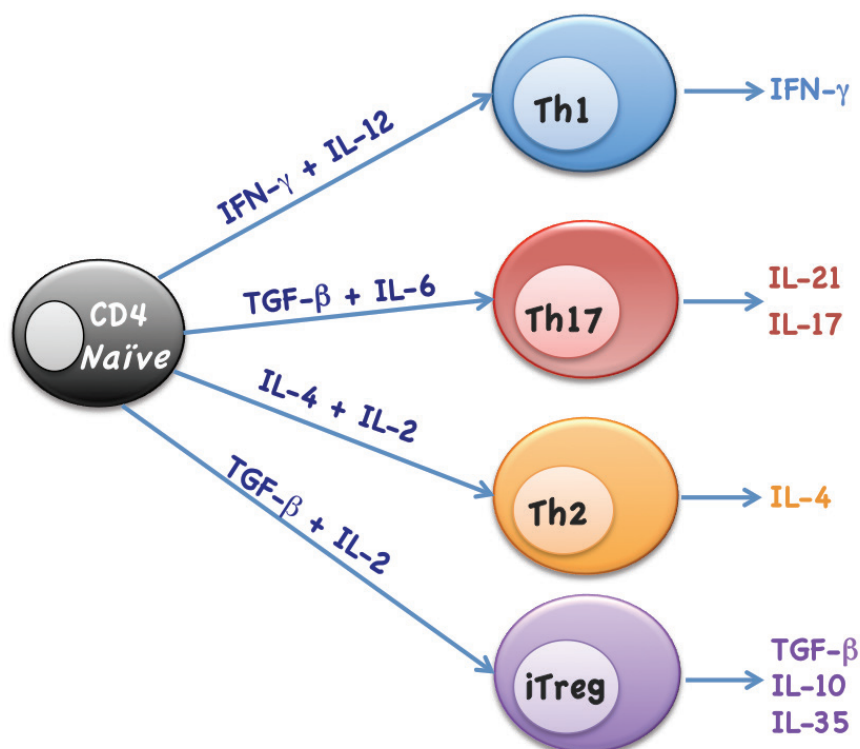


Figura 7. Diferenciación de las células T CD4. Esquema simplificado de los principales linajes a los que diferencian las células CD4 *naïve* tras el encuentro con el antígeno y las citoquinas implicadas. Modificado de (Zhou et al., 2009)

Las células **Th2** producen IL-4, IL-5 e IL-13 y están implicadas en la inmunidad humoral frente a patógenos extracelulares, estimulando la proliferación de las células B (Mowen and Glimcher, 2004). Para su diferenciación se requiere de la acción de los factores de transcripción GATA3 y STAT6, y sus citoquinas inhiben la diferenciación hacia Th1. Las células **Th17** producen IL-17A (IL-17), IL-17F e IL-22. Son importantes en la inmunidad frente a bacterias y hongos, principalmente en mucosas. Su diferenciación requiere de la inducción de ROR γ t, un factor de transcripción que se induce por TGF- β en combinación con la IL-6, IL-21 e IL-23, citoquinas que activan al factor de transcripción STAT3 (Chen et al., 2007).

Las células **Treg inducidas FOXP3⁺ (iTreg)** se generan en periferia principalmente por mecanismos dependientes de TGF- β (Chen et al., 2003). Estas células poseen también capacidad supresora (Fantini et al., 2006).

La generación de IL-2 por células CD4 es importante en los procesos de diferenciación de las distintas poblaciones efectoras y reguladoras. En la diferenciación a células Th1, la producción inicial de IL-2 es independiente del ciclo celular (Reem and Yeh, 1984), promoviendo y regulando la producción inicial de IFN- γ (Bream et al., 2004). La presencia de la IL-2 en el proceso de diferenciación de las Th2 es importante, ya que favorece la accesibilidad de la cromatina en el *locus* de la IL-4 mediado por STAT5 (Zhu et al., 2003). La IL-2 puede disminuir la generación de Th17 mediante su señalización por STAT5 (Laurence et al., 2007), que se une al promotor de *Il17*. Como la IL-6 señala a través de STAT3, se ha propuesto que

el balance STAT5/STAT3 puede determinar la posterior diferenciación de las células a Th17 o no (Yang et al., 2011b). El papel de la IL-2 en el mantenimiento de la población Th17 es complejo, ya que otros estudios han descrito que favorece la expansión de las Th17 una vez generadas (Amadi-Obi et al., 2007). En el proceso de diferenciación a iTreg es necesaria la presencia de la IL-2 (Zheng et al., 2007a), pero además se necesita que la señal de estimulación del TCR sea débil, o la dosis de antígeno sea baja, traducándose en una señal débil de la ruta de la PI3K (Turner et al., 2009).

6.4 Papel de la IL-2 en el desarrollo y la actividad de las Treg

La IL-2 es dispensable para la generación de las Treg naturales en el timo, ya que los ratones deficientes para IL-2 y CD25 no muestran deficiencias en Treg naturales (Fontenot et al., 2005). Este fenómeno es debido a que la deficiencia de IL-2 en timo está compensada por la IL-15, y por ello, los ratones deficientes para CD122 desarrollan autoinmunidad (Suzuki et al., 1995). La generación del ratón doble deficiente para IL-2 e IL-15 confirmó lo anterior, al observar una reducción significativa en el desarrollo de Treg en timo y en periferia (Burchill et al., 2007).

Asimismo, la IL-2 es importante para la supervivencia de las Treg naturales una vez generadas (Yu et al., 2009). Las Treg no son capaces de producir suficiente IL-2 ni *in vivo* (Chen et al., 2011) ni *in vitro* (Thornton and Shevach, 1998), pero al expresar constitutivamente altos niveles de CD25, pueden utilizar la IL-2 existente en su entorno (Letourneau et al., 2009; Sakaguchi et al., 1995; Thornton and Shevach, 1998).

Además de su relevancia en la población de Treg naturales, la IL-2 es esencial para las diferenciación de las iTreg en periferia, ya que la neutralización con anticuerpos frente a la IL-2 da lugar a una fuerte reducción de la expresión de FOXP3 en la periferia (Setoguchi et al., 2005). A diferencia de lo que sucede en timo, la IL-2, pero ninguna de las citoquinas que señalizan por γc , pueden reemplazar el requerimiento de estimulación vía CD28 en la inducción de FOXP3 *in vitro* con anti-CD3 y TGF- β (Davidson et al., 2007). Asimismo, la necesidad de señalización por TGF- β en la generación de las iTreg se demostró con los ratones deficientes para TGF- β 1 y para el receptor TGF- β R2, ya que no muestran alteraciones del desarrollo tímico de las Treg naturales pero desarrollan un síndrome linfoproliferativo autoinmune con fenotipo Th1 y reducido número de Treg en periferia (Marie et al., 2005; Marie et al., 2006).

Con todos estos antecedentes, decidimos estudiar el papel de la DGK α en la activación y diferenciación de los linfocitos T CD4 y CD8, junto con la implicación de las señales tolerogénicas y de la IL-2 en estos procesos.

OBJETIVOS

Se ha demostrado que la funcionalidad de la DGK α es importante en la regulación de la ruta de Ras por el TCR, y que aumentos en su expresión contribuyen a la inducción de anergia, sugiriendo un papel para esta enzima en el control de la tolerancia periférica. Sin embargo, los estudios se han centrado en las etapas iniciales de la activación por antígeno, y no se ha examinado en detalle la contribución de la DGK α a los mecanismos de diferenciación de las distintas poblaciones T, ni a la respuesta inmune frente a tumores.

En el presente trabajo pretendemos estudiar en detalle el papel de esta enzima en la diferenciación de las poblaciones T activadas y la implicación de la IL-2 en este proceso, además de analizar su participación en el control de los mecanismos de tolerancia inducidos por los tumores. Para ello hemos planteado los siguientes objetivos:

1. Determinar la contribución de la DGK α al desarrollo del programa de activación, analizando en detalle las diferencias entre la coestimulación frente a la señal incompleta del TCR y su posible redundancia con otras isoformas de DGK.
2. Estudiar el papel de la DGK α en el desarrollo del programa citotóxico de los linfocitos T CD8 *in vitro*.
3. Examinar la respuesta *in vivo* de las células T deficientes para DGK α y su implicación en el mantenimiento de la tolerancia empleando un modelo de inducción de tumores en ratones inmunocompetentes.
4. Estudiar la contribución de la DGK α en la diferenciación de células T CD4 reguladoras y efectoras *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Reactivos

Reactivo	Casa Comercial
Anti- α tubulina	Sigma-Aldrich
Anti-CD28	BD Pharmingen
Anti-CD3 ϵ	BD Pharmingen
Anti-DGK α	Producido en el laboratorio
Anti-DGK ζ	Abcam
Anti-ERK	Cell signaling
Anti-FoxO1	Cell signaling
Anti-GAPDH	Santa Cruz Biotechnology
Anti-IgG de conejo acoplada a peroxidasa	Dako
Anti-IgG de hámster	Jackson immunoresearch
Anti-IgG de ratón acoplada a peroxidasa	Dako
Anti-MEK	Cell signaling
Anti-pERK	Cell signaling
Anti-pFoxO1/3	Cell signaling
Anti-pMEK	Cell signaling
Anticuerpos citometría	BD Pharmingen y eBioscience
Aprotinina	Roche
Brefeldina A	Sigma-Aldrich
CFSE	Molecular Probes (Invitrogen)
DAG	Avanti Polar Lipids
ECL (Enhanced Chemiluminiscence)	Amersham
γ -32 ATP	Hartmann Analytic
IL-2	Peprtech
Inhibidor DGK R599949	Sigma-Aldrich
Ionomicina	Calbiochem
Leupeptina	Roche
Nonidet P-40	Sigma-Aldrich
OVA (257-264)	Anaspec
OVA (323-339)	Anaspec
PD 98059	Calbiochem
PMA	Sigma-Aldrich
PMSF	Sigma-Aldrich
Q4H7	Anaspec
TGF- β	Peprtech

2. Líneas celulares y medios de cultivo

Las células EL4 (ATCC TIB-39) y los linfocitos primarios de ratón se cultivaron en medio RPMI suplementado con 10% de FBS (suero fetal bovino), 2mM de glutamina, 50mM de β -mercaptoetanol, y 100 U/ml de penicilina y estreptomicina.

3. Cepas de ratones

Los ratones deficientes para DGK α (DGK $\alpha^{-/-}$) han sido descritos anteriormente (Olenchok et al., 2006) y han sido llevados a fondo genético C57BL/6J.

Los ratones C57BL/6-Tg (Tcr α Tcr β) 425Cbn/J (OT-II) y C57BL/6-Tg (Tcr α Tcr β) 1100Mjb/J (OT-I) proceden de Jackson Laboratory y han sido cedidos por el Dr. Carlos Ardavín. Los ratones C57BL/6J WT y DGK $\alpha^{-/-}$ han sido cruzados con los OT-I y OT-II en el animalario del CNB. Todos los experimentos con ratones se realizaron con la aprobación del Comité de Ética Animal del Centro Nacional de Biotecnología y en conformidad con las Directivas nacionales y europeas.

4. Aislamiento de linfocitos primarios de ratón

Ratones de entre seis y doce semanas de edad fueron sacrificados y los timos, ganglios o bazos fueron extraídos y recogidos en PBS (tampón fosfato salino) frío y disgregados mecánicamente sobre un filtro de 45 micras. Las células libres en suspensión fueron centrifugadas durante 5 minutos a 1.200 rpm y resuspendidas en un volumen adecuado de PBS para proceder a su recuento. En el caso de los bazos además se resuspendieron las células en 2 ml de tampón de lisis de eritrocitos (0,154M NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0.1 mM EDTA pH 7.4) y se incubaron 2 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron con PBS, centrifugaron durante 5 minutos a 1.200 rpm y se resuspendieron en un volumen adecuado de PBS para proceder a su recuento. El posterior aislamiento de linfocitos T se realizó mediante selección negativa con Dynabeads (Invitrogen) acopladas a anticuerpos específicos.

5. Ensayo DGK

La actividad DGK se ensayó *in vitro* mediante la incorporación del fosfato gamma de una molécula de ATP marcado radiactivamente (P³²) utilizando como sustrato la molécula de DAG de cadena de ocho átomos de carbono, 1,2-octanoil-*sn*-glicerol (C8-DAG), para dar lugar a ácido fosfatídico con una cadena de ocho átomos de carbono marcado con ³²P (C8-³²PA). Se centrifugaron las células T de bazo, ganglios y timo a 1.200 rpm, 4°C durante 5 minutos y fueron lisadas con ayuda de jeringas 25G en tampón hipotónico Tris 50 mM (pH 7,5) frío con inhibidores de proteasas y fosfatasas. Se centrifugaron a 12.000 rpm 4°C y se cuantificó la proteína en los sobrenadantes, guardando una fracción para el control posterior por Western Blot (WB). A 25 μ g de proteína se añadió C8-DAG (0,5 mM) previamente sonificado en Tris 50 mM pH 7,5 durante 10 min a temperatura ambiente. La reacción se inicia añadiendo la mezcla de reacción (1 mM ATP, 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 1 mM DTT y 10 μ Ci [γ -³²P]-ATP) e incubando durante 10 min a temperatura ambiente en un volumen final de 50 μ L. La reacción se detiene mediante la adición de 1N HCl. Los lípidos fueron extraídos con CHCl₃/MeOH (2:1,

v/v). La fase orgánica fue recuperada, secada mediante vacío y se aplicó en placas de cromatografía en capa fina (TLC, Whatman), que se desarrolló en un tanque con $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/4 \text{ M NH}_4\text{OH}$ (9:7:2, v/v/v). Posteriormente se procedió a su secado y visualización por autorradiografía.

6. Electroforesis de proteínas y Western Blot

Las células fueron lisadas a 4° C durante 15 minutos en el tampón de lisis p70 (10 mM HEPES pH 7.5, 15 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 10% glicerol y 0.2% NP-40) conteniendo inhibidores de proteasas y fosfatasa (20 μM leupeptina, 1.5 μM aprotinina, 1 mM PMSF, 1 mM Na_3VO_4 , 40 mM β -glicerofosfato y 2 mM NaF). El lisado fue centrifugado a 13.000 rpm, 4°C durante 15 minutos. El sobrenadante fue cuantificado a 660 nm con el reactivo Pierce Protein Assay (Thermo Scientific). Las muestras fueron desnaturalizadas a 96°C en tampón de carga con SDS y cantidades equivalentes de cada muestra fueron analizadas por SDS-PAGE. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF preactivada con metanol (Bio-Rad), bloqueadas e incubadas con anticuerpos específicos. La detección de los anticuerpos se realizó con ECL (Enhanced Chemiluminescence, Amersham).

7. Estimulaciones de linfocitos T primarios de ratón *in vitro*

A. Estimulaciones con anticuerpo soluble

Células T aisladas se separaron en tubos de 1,5ml a una concentración de 10^7 células/ml en medio RPMI completo y se preincubaron con anticuerpo anti-CD3 ϵ (4 $\mu\text{g}/\text{ml}$) en presencia o ausencia de anti-CD28 (4 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante 15 minutos a 4°C en medio completo. Se lavaron con PBS y se resuspendieron en RPMI completo a la misma concentración. Para la estimulación se incubaron con anti-hámster armenio IgG (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) en medio RPMI completo durante los tiempos indicados a 37°C.

B. Estimulaciones con anticuerpo anti-CD3 pegado a placa

Para los experimentos de proliferación y activación, células de ganglio (2×10^6 células/ml) se estimularon con anti-CD3 que ha sido pegado a placa durante 1 hora a 37°C o dejado a 4°C durante 16 horas (2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) en presencia o ausencia de anti-CD28 (1,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$), IL-2 (50 U/ml), o el inhibidor de DGKs R59949 (15 μM) durante los tiempos indicados.

C. Estimulación con péptidos de diferente afinidad por el TCR transgénico en el modelo OT-I

Células de ganglio o linfocitos T CD8 se estimularon con el péptido soluble de alta afinidad para el TCR transgénico (OVA 257-264, SIINFEKL, 2 μ M), o su variante de baja afinidad (Q4H7, SIIQFEHL, 2 μ M) durante los tiempos indicados.

D. Estimulación con péptido específico para el TCR transgénico en el modelo OT-II

Células de ganglio o de bazo se estimularon con el péptido soluble de alta afinidad para el TCR transgénico (OVA, 323-339) a una concentración alta (10 μ g/ml) o baja (1 μ g/ml) durante los tiempos indicados.

E. Inducción de células T efectoras o reguladoras por TGF- β *in vitro*

Células CD4⁺CD25⁻ aisladas se estimularon durante 6 días con anti-CD3 pegado a placa (2,5 μ g/ml), anti-CD28 soluble (1,25 μ g/ml), IL-2 (50 U/ml) para diferenciar hacia células efectoras, y conjuntamente con TGF- β (5 ng/ml) para diferenciar a células iTreg. En el modelo OT-II, células de bazo fueron estimuladas durante 5 días con el péptido específico frente al TCR transgénico OVA (323-339; 10 μ g/ml) en presencia o ausencia de TGF- β (5 ng/ml).

8. Citometría de flujo

Las células fueron recogidas, lavadas y teñidas con los anticuerpos en tampón de tinción (PBS con 2% de FBS y 0.02% de azida sódica). La tinción intracelular de FOXP3 fue realizada con el kit de tinción de FOXP3 (eBioscience). Para la medida de citoquinas, las células tras ser activadas con el estímulo apropiado o procedentes de los tumores fueron lavadas, estimuladas con PMA (Forbol-12-miristato-13-acetato, 50 ng/ml) e ionomicina (1 μ g/ml) en presencia de Brefeldina A (1 μ g/ml) durante 4 h, y teñidas con los anticuerpos específicos. La tinción de citoquinas fue realizada con el kit Intraprep (Beckman Coulter). Las muestras fueron adquiridas en el citómetro Gallios (Beckman Coulter) y el análisis fue realizado mediante la utilización del programa FlowJo v 9.5 (Tree Star).

A. Marcaje por CFSE (Carboxifluoresceína succinimidil ester)

Células T de ganglio, CD4⁺CD25⁻ aisladas o de bazo (OT-II) se marcaron con CFSE (2,5 μ M) en PBS durante 10 minutos a 37°C, deteniendo la reacción con medio RPMI completo. Se lavaron dos veces a 1.200 rpm con medio completo y se resuspendieron a la concentración necesaria para su estimulación. La dilución de CFSE se visualizó por citometría de flujo tras 48 o 72 h de estimulación.

B. Ensayo de proliferación de células CD4 y supresión por Treg *in vitro*

in vitro

Células T CD4 *naïve* (CD4⁺CD25⁻) y Treg (CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺) fueron aisladas con el kit de aislamiento de células Treg de ratón (Miltenyi Biotec). 60.000 células CD4 *naïve* fueron marcadas con CFSE (2,5 µM) y estimuladas con anti-CD3 soluble (1 µg/ml) con o sin anti-CD28 (2 µg/ml) en presencia de células de bazo irradiadas como células presentadoras (APCs). Para el ensayo de supresión propia, las células Treg fueron añadidas en un ratio 1:2 (Treg: CD4⁺CD25⁻). En el caso de los ensayos de supresión cruzada (WT frente a DGKα^{-/-} y viceversa), el ratio utilizado fue de 1:1.

9. Análisis por Luminex de producción de citoquinas en los sobrenadantes

Los sobrenadantes de los cultivos se recolectaron después de 5 días de inducción *in vitro* de iTreg en el modelo OT-II y se midieron las concentraciones de las citoquinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN-γ e IL-17 utilizando el Multiplex Luminex kit (Millipore).

10. Extracción de RNA y obtención del DNA copia (cDNA)

Células T purificadas de bazo, timo y ganglios fueron lisadas por pipeteo con TRIzol (Invitrogen) y se obtuvo el ARN mediante extracción con cloroformo y precipitación con etanol. El DNA copia fue sintetizado a partir del RNA después de ser tratado con DNAsa (Invitrogen) con el Kit SuperScript II Reverse (Invitrogen).

11. PCR semicuantitativa

Las reacciones de PCR del DNA copia fueron realizadas con los cebadores de la tabla adjunta con las siguientes condiciones: 95°C 2 min; 30 ciclos de tres pasos: 95°C 1 min, 58°C 1 min y 72°C 1 min, y una extensión final de 72°C 3 min. Los productos de PCR fueron aplicados en un gel de agarosa, y una vez desarrollada la electroforesis fueron teñidos con bromuro de etidio y fotografiados con el sistema GelDoc (Bio-Rad Laboratories).

GEN	CEBADOR DIRECTO	CEBADOR REVERSO
<i>Dgka</i>	5' ATGGCCAAAGAGAAGGGCCTC 3'	5' GCAGTGGCACTGTGGTAGCCC 3'
<i>Dgkb</i>	5' TGTGGACCCTTGAAGGACCATATTTTG 3'	5' CGGTTTCTTGTTCTTTTGATGAGGGAGCAG 3'
<i>Dgkg</i>	5' TGCGTGTGGTGCCGGATGAC 3'	5' CGGAGGCATCGTGCGAGGTC 3'
<i>Dgkd</i>	5' GTGGTGATCTCATCAGCC 3'	5' TCTTCTCAGATTCAGAGAGG 3'
<i>Dgke</i>	5' CTCAGTTCGAGTCCTTGTTTG 3'	5' ATAGACGCCAACGATTTCCAG 3'
<i>Dgkz</i>	5' GGACCTCCGAGCAGAGCCCA 3'	5' GGCTCACCGTCCACCTGCAC 3'
<i>Dgkh</i>	5' AGCAGGAGGGGCCCCAGAAG 3'	5' CAGGACAGGCCGTGGGAGGT 3'
<i>Dgkq</i>	5' TGCTGGCTGGTGACGCTGC 3'	5' CAGACAGGGGCAGTGCCTGC 3'
<i>Dgki</i>	5' GAAACCCAGACCTGCCGCCC 3'	5' GCCAACCGACATGGCTCCCC 3'
<i>Dgkk</i>	5' TGCGCAGTGCCATGAGGTGG 3'	5' AGGAAGCTGCGCCTGCTTCG 3'
<i>Actb</i>	5' TAAACGCGAGCTCAGTAACAGT 3'	5' TGGAATCCTGTGGCATCCATGA 3'

12. PCR cuantitativa

La PCR cuantitativa se realizó con cebadores específicos detallados en la siguiente tabla empleando la mezcla Fast SYBR green master mix (Applied Biosystems) en un secuenciador ABI Prism 7900HT iCycler (Applied Biosystems). El análisis de datos se realizó con el programa SDS v2.2.2. Todos los datos de expresión de genes fueron relativizados a la expresión del gen *Rplp0* utilizando el método matemático $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: 50°C 10 min, 95°C 2 min, 40 ciclos de 95°C 15 seg y 60° 1 min.

GEN	CEBADOR DIRECTO	CEBADOR REVERSO
<i>Rplp0</i>	5' TAAAGACTGGAGACAAGGTG 3'	5' GTGTACTCAGTCTCCACAGA 3'
<i>Sell</i>	5' CCAAGTGTGCTTTCAACTGTTC 3'	5' AAAGGCTCACACTGGACCAC 3'
<i>Prfl</i>	5' CGTCTTGTTGGGACTTCAG 3'	5' GCATTCTGACCGAGGGCAG 3'
<i>Dgka</i>	5' GTCTACTGCTACTTCACCCTCC 3'	5' CTTCCGTGCTATCCAGGATCC 3'

13. Modelos de inducción de tumores

A. Inducción de tumores singénicos EL4 intraperitoneal

Se inocularon ratones C57BL/6J WT y $DGK\alpha^{-/-}$ de 8-12 semanas de edad intraperitonealmente con $2,5 \times 10^6$ células EL4. Se monitorizó el peso de los ratones y la supervivencia 3 veces por semana durante un máximo de 90 días y se fotografiaron los tumores a día de la muerte.

B. Inducción de tumores singénicos EL4 subcutáneo

Se generaron tumores subcutáneos en el flanco derecho de ratones C57BL/6J WT y $DGK\alpha^{-/-}$ de 8-12 semanas de edad por inoculación de $2,5 \times 10^6$ células EL4, cuyo crecimiento se monitorizó tres veces por semana mediante la medida de su volumen con un calibre. El cálculo del volumen se realizó mediante la aplicación de la fórmula $(A^2 \times B)/2$, donde A= anchura y B= longitud en milímetros. A día 9 y a día 21 (tiempo final) se sacrificaron los ratones y se extrajeron los tumores para posteriormente pesarlos, limpiarlos, disgregarlos mecánicamente, y obtener el infiltrado leucocitario mediante tinción por citometría de flujo.

14. Análisis estadístico

Los datos se analizaron con el programa GraphPad Prism, aplicando la prueba t de Student no pareado y siendo $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$. En el análisis de supervivencia se utilizó un Log-Rank Test.

RESULTADOS

1. EXPRESIÓN DE DGKS EN LINFOCITOS T

Los linfocitos T expresan de forma mayoritaria las isoformas α y ζ de DGK, aunque en mamíferos se han descrito hasta 10 isoformas de DGKs, distribuidas en cinco subtipos diferentes (Merida et al., 2008). Para investigar si la deficiencia en DGK α afecta la expresión de otras isoformas en las células T comparamos la expresión de las distintas DGKs en órganos linfoides. Las secuencias de las 10 isoformas se amplificaron por PCR semicuantitativa empleando cebadores específicos. Empleamos RNA de linfocitos T de timo, bazo y ganglios y RNA de cerebro como control positivo, tejido en el que se expresan la mayoría de las DGKs. El análisis reveló la presencia de múltiples isoformas en tejidos hematopoyéticos (**Fig 8**), destacando en timocitos la presencia de prácticamente todas las isoformas, excepto DGK β y κ . El análisis en órganos periféricos (bazo y ganglios) reveló que el perfil de expresión de isoformas es más restringido en los linfocitos T maduros, que expresan DGK α como la única DGK de tipo I y DGK δ como la única DGK de tipo II. No se observó expresión de la DGK θ (tipo V), mientras que se expresan las dos DGKs de tipo IV (ζ , ι) así como la DGK ϵ (tipo III).

El análisis de tejidos de ratones deficientes en DGK α no reveló variaciones importantes en la expresión de las otras isoformas, sugiriendo que no existen mecanismos de compensación entre isoformas de los diferentes subtipos. La falta de anticuerpos específicos para la mayoría de las isoformas hizo imposible confirmar la expresión de proteína.

	Tipo I			Tipo II			Tipo III	Tipo IV		Tipo V	
	α	β	γ	δ	η	κ	ϵ	ζ	ι	θ	
WT	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	Timo
DGK $\alpha^{-/-}$	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	
WT	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	Bazo
DGK $\alpha^{-/-}$	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	
WT	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	Ganglios
DGK $\alpha^{-/-}$	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	
	α	β	γ	δ	η	κ	ϵ	ζ	ι	θ	
WT	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	Cerebro

Figura 8. Patrón de expresión de DGKs en órganos linfoides de ratón. La expresión de las diferentes isoformas de DGKs se determinó por RT-PCR semicuantitativa en timo, bazo y ganglios linfáticos aislados de ratones control (WT) y deficientes en DGK α . El cerebro de ratones WT se utilizó como control de expresión positiva, ya que en este tejido se expresan la mayor parte de isoformas.

2. CONTRIBUCIÓN DE LA DGK α A LA ACTIVIDAD DGK EN LINFOCITOS T

Los linfocitos T quiescentes expresan elevados niveles de DGK α (Sanjuan et al., 2003) por lo que a continuación nos propusimos determinar la aportación de esta isoforma a la actividad DGK total en estado basal. Para ello, se prepararon lisados de linfocitos T de bazo, timo y ganglios de ratones control y deficientes en DGK α y se realizaron ensayos de fosforilación empleando como sustrato DAG (Fig 9 A, B). La cuantificación del PA producido reveló una contribución de un 30% por parte de la DGK α a la actividad DGK total en todos los tejidos analizados (Fig 9 C). Esta contribución parcial correlaciona con su localización citosólica en una conformación inactiva en ausencia de estimulación (Sanjuan et al., 2001).

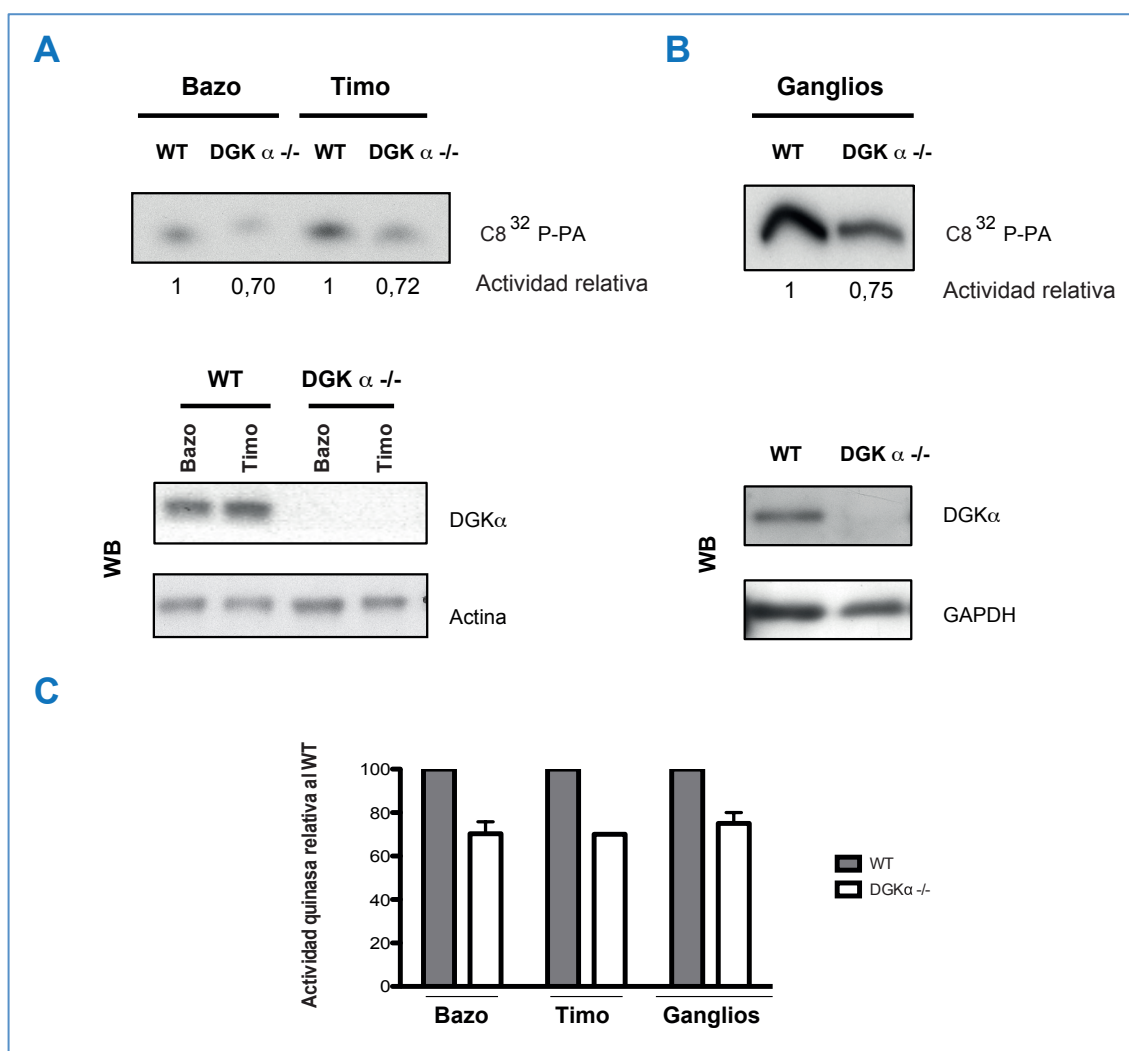


Figura 9. Contribución de DGK α a la actividad DGK total en células T en estado basal. La actividad DGK total se determinó en células T de bazo y timo (A) y ganglios (B) de ratones control y deficientes para DGK α . Panel superior: Autoradiografía de un experimento representativo. La actividad relativa se determinó al considerar como uno la actividad de los ratones control. Panel inferior: Análisis por WB de los lisados celulares usados en los ensayos de actividad. Se evaluó la expresión de DGK α y los niveles de GAPDH o Actina se utilizaron como controles de carga. (C) Media de las cuantificaciones de actividad DGK total de los diferentes experimentos, n= 4 por grupo.

3. PAPEL DE LA DGK α EN LA ACTIVACIÓN DE LOS LINFOCITOS T

3.1 Contribución de la DGK α a la activación de la ruta Ras/ERK/AP-1

Tras comprobar su contribución a la actividad DGK total en linfocitos en estado basal, quisimos analizar la contribución de la DGK α al programa de activación iniciado por estimulación del TCR y su molécula coestimuladora CD28. Como se ha descrito anteriormente, la DGK α regula negativamente la ruta de Ras/ERK tras la activación del TCR (Olenchok et al., 2006; Sanjuan et al., 2003) y es uno de los genes sobreexpresados en anergia, (Macian et al., 2002), proceso que se produce tras la estimulación del TCR en ausencia de coestimulación (Li et al., 1996). El análisis por WB de la ruta de Ras/ERK en linfocitos de ganglios de ratones WT y DGK $\alpha^{-/-}$ confirmó un ligero efecto de la deficiencia de la DGK α en la activación inicial de la ruta de ERK, mostrando una mayor estimulación de la ruta en ausencia de coestimulación (Fig 10).

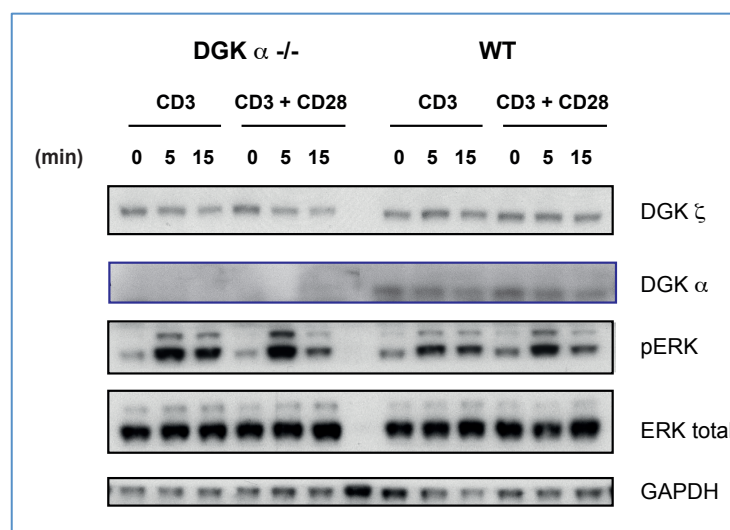


Figura 10. La deficiencia de DGK α promueve la activación de ERK a tiempos tempranos. Se aislaron células T de ganglios de ratones WT y deficientes para DGK α . Las estimulaciones se efectuaron con el anticuerpo contra el TCR (anti-CD3), o bien por entrecruzamiento (anti-CD3 + anti-CD28) solubles. Los lisados totales de las células se analizaron por WB para determinar el grado de fosforilación de ERK y la expresión de DGK α y DGK ζ . Como control de carga se determinaron los niveles de ERK total y GAPDH.

Tras observar este efecto decidimos estudiar en más detalle la contribución de la DGK α a la activación de los efectores de Ras en respuesta al TCR en presencia o ausencia de coestimulación. Para ello analizamos la inducción de diferentes parámetros de activación por citometría de flujo en poblaciones CD4 y CD8 de ratones WT y DGK $\alpha^{-/-}$. Para examinar la contribución de otras DGKs empleamos el inhibidor farmacológico de las DGKs R59949, (R59). El R59 es un inhibidor general de las DGKs que se une al dominio catalítico y es particularmente selectivo *in vitro* para las DGKs de tipo I (α , β , γ) (Jiang et al., 2000b).

Resultados

Células de ganglios de ratones WT y deficientes para DGK α se trataron en condiciones de estimulación (anti-CD3) o coestimulación (anti-CD3 y anti-CD28) en presencia y ausencia de R59. En primer lugar determinamos por citometría de flujo en linfocitos T de ratones WT la expresión en superficie de CD69, un marcador de activación temprana inducido por AP-1 en respuesta a la activación del eje Ras/ERK (D'Ambrosio et al., 1994), cuya expresión es muy sensible a la regulación negativa ejercida por la DGK α (Sanjuan et al., 2003). Además, se ha demostrado que la sobreexpresión de una forma catalíticamente inactiva de DGK α influye positivamente en esta ruta (Jones, 2002).

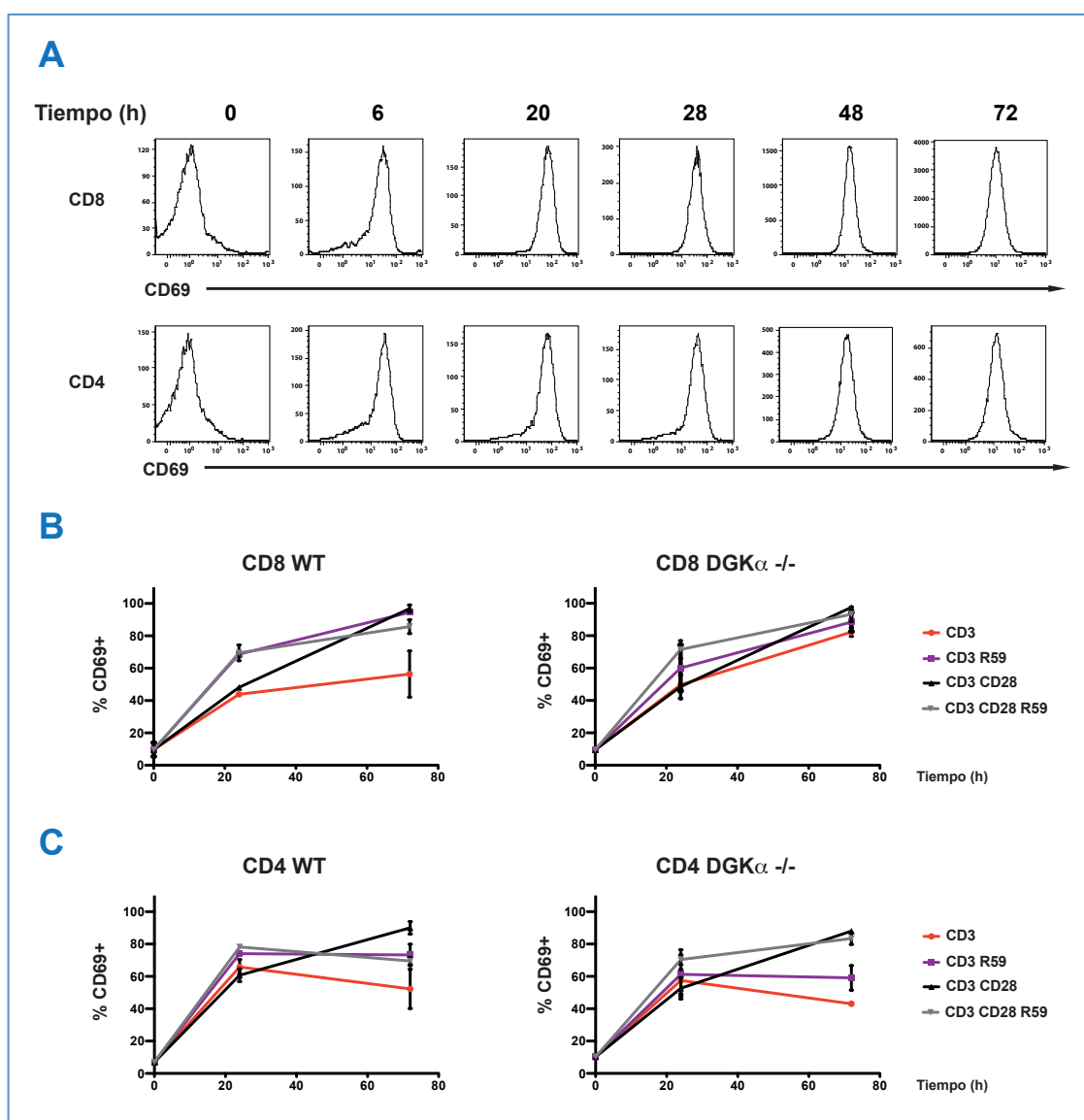


Figura 11. Efecto de la DGK α en la expresión en superficie de CD69. Células de ganglios de ratones WT y deficientes para DGK α fueron estimuladas con anti-CD3 pegado a placa solo, junto con anti-CD28 soluble, el inhibidor de DGKs R59, o con ambos durante los tiempos indicados. Los niveles del marcador de activación temprana CD69 se determinaron por citometría de flujo en las subpoblaciones T CD4 y CD8. **(A)** Expresión de CD69 en el tiempo tras la estimulación con anti-CD3 para las poblaciones CD4 y CD8 de un ratón WT. **(B y C)** Media del porcentaje de células que expresan CD69 a lo largo del tiempo en ratones WT y deficientes en DGK α en células CD8 y CD4. Se realizaron 2 experimentos independientes con n=4 por grupo.

Tras monitorizar en detalle la cinética de inducción de CD69 con anti-CD3 tanto en células CD4 como CD8 (**Fig 11 A**), elegimos 2 tiempos de observación para aplicar los tratamientos: 24 h, cuando se observa máxima expresión al estimular con anti-CD3, y 72 h, donde la expresión de CD69 es máxima en condiciones de coestimulación. Como se ha descrito previamente (Sadra et al., 1999), observamos que la coestimulación de linfocitos T CD8 estabiliza la expresión de CD69, aumentando de forma significativa el porcentaje de células que expresan este marcador a tiempos largos (**Fig 11 B izda**). El tratamiento con R59 mimetizó el efecto de la señal coestimuladora sobre la expresión de CD69 en linfocitos CD8 WT (**Fig 11 B izda**). Estos resultados sugieren que la coestimulación en linfocitos CD8 resulta en una inhibición de la actividad DGK. El análisis de células CD8 deficientes en $DGK\alpha$ reveló un porcentaje más alto de células positivas para CD69 tras la estimulación con anti-CD3, cercano al observado en respuesta a la coestimulación (**Fig 11 B dcha**). La ganancia en estas células tras el tratamiento con el inhibidor fue muy discreta, confirmando que la $DGK\alpha$ es la principal isoforma que limita la activación de la ruta de Ras/ERK por el TCR.

Un análisis similar en linfocitos T CD4 mostró un efecto mucho menor del inhibidor en estas poblaciones de linfocitos (**Fig 11 C izda**). Asimismo, la inducción de CD69 tras la estimulación del TCR en células CD4 deficientes en $DGK\alpha$ resultó ser muy similar a la observada en las células WT (**Fig 11 C dcha**), lo que sugiere una menor contribución de la $DGK\alpha$ como regulador negativo en la activación de esta ruta por CD28 en las células CD4.

3.2 Influencia de la $DGK\alpha$ en la proteólisis de CD62L

La activación de los linfocitos T se traduce en la disminución de la expresión de la Selectina CD62L que mantiene a los linfocitos *naïve* en los órganos hematopoyéticos. La expresión de CD62L en la membrana se controla por dos procesos: la tasa de transcripción del gen que lo codifica, y la tasa de su ruptura por proteólisis (Chao et al., 1997). En respuesta a la estimulación del TCR se produce una rápida proteólisis de la molécula por un mecanismo que depende de la proteasa TACE y que requiere de la activación de Ras/ERK (Preece et al., 1996). Posteriormente, la expresión de CD62L se recupera debido a un incremento en su mensajero. Durante los días siguientes a la activación de las células T, y tras la secreción de citoquinas que dan lugar a la diferenciación a células T efectoras se produce una nueva bajada de los niveles de CD62L, resultando en un aumento de células CD62L negativas, mientras que en la posterior diferenciación a células de memoria su expresión vuelve a aumentar (Kaech et al., 2002). Con estos antecedentes, decidimos analizar la influencia de la deficiencia de la $DGK\alpha$ en la proteólisis y recuperación de los niveles de CD62L tras la estimulación del TCR. Un análisis inicial de la cinética de expresión de CD62L tras la estimulación con CD3 en ratones WT confirmó que la proteólisis se observa a tiempos muy tempranos (**Fig 12 A**), por lo que

decidimos centrarnos en las primeras horas de estimulación. El análisis de la expresión de CD62L en condiciones basales mostró un nivel de expresión similar en ratones WT y deficientes en DGK α , lo que sugiere que la deficiencia en esta enzima no induce activación basal de la ruta Ras/ERK (**Fig 12 B**). El estudio de la cinética de expresión en superficie de CD62L tras estimulación con anti-CD3 reveló una mayor proteólisis en células CD8 DGK $\alpha^{-/-}$, sin observar efectos importantes en la proteólisis inicial en linfocitos CD4 DGK $\alpha^{-/-}$, lo que coincide con la existencia de una señal de Ras/ERK aumentada en las células CD8 (**Fig 12 C**).

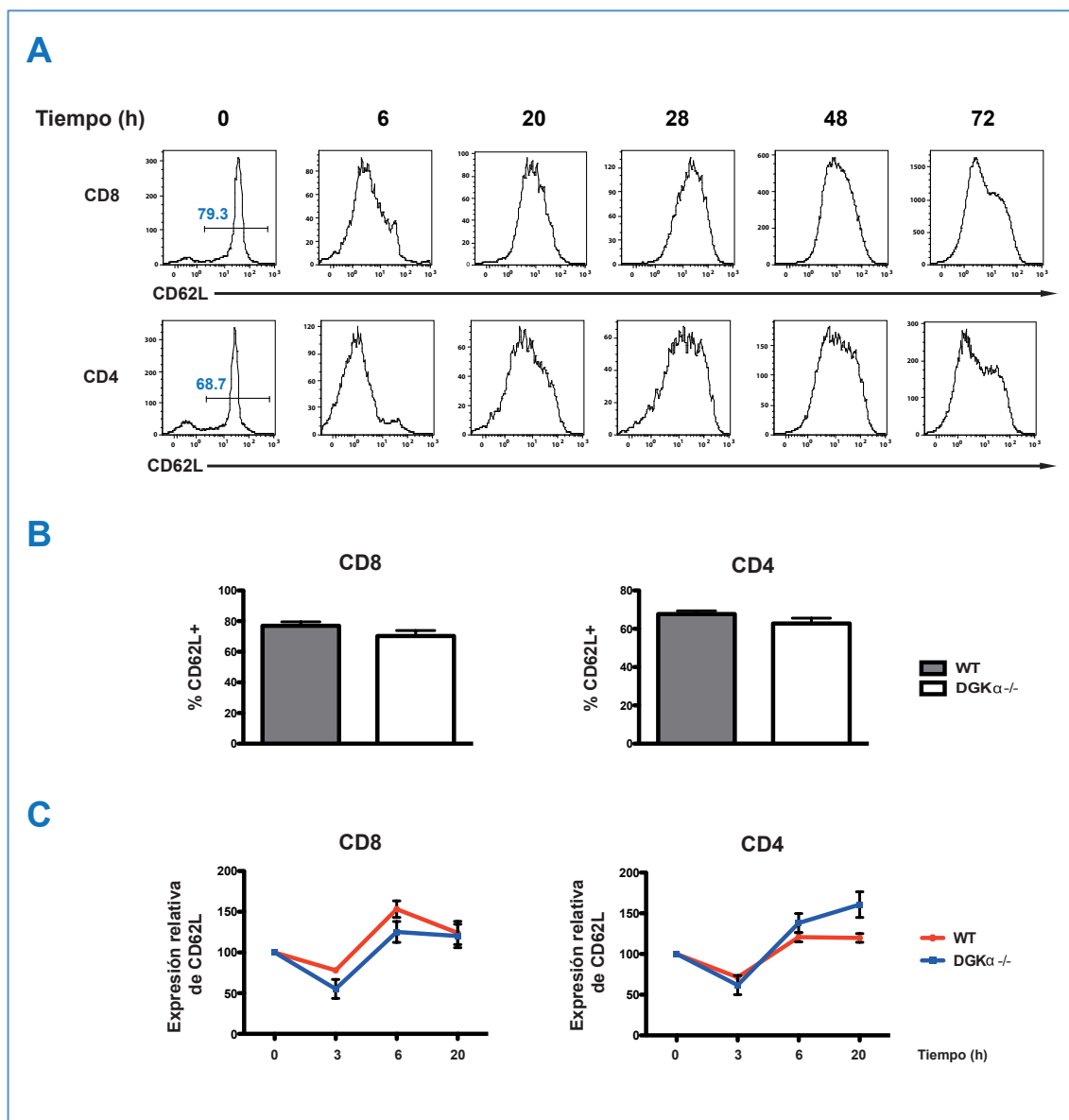


Figura 12. Efecto de la DGK α en la expresión de CD62L. Células de ganglios de ratones WT y deficientes para DGK α se estimularon con anti-CD3 pegado a placa durante los tiempos indicados y los niveles en superficie del marcador de activación CD62L se determinaron por citometría de flujo en las subpoblaciones T CD4 y CD8. **(A)** Histogramas de la expresión de CD62L en el tiempo para las poblaciones CD4 y CD8 de un ratón WT. **(B)** Porcentaje de células CD62L+ (en CD4 y en CD8) en estado basal en ratones WT y deficientes para DGK α . **(C)** Valores promedio de la expresión normalizada de CD62L durante la estimulación con anti-CD3 en células CD4 y CD8. La expresión se relativizó al considerar el porcentaje positivo basal como 100. Los datos corresponden a la media de 2 experimentos independientes con n=4 por grupo.

3.3 Contribución de la DGK α a la inducción de CD25

La activación de las señales coestimuladoras junto con la estimulación del TCR es crítica para la expresión de la cadena α del receptor de IL-2, CD25 (Ledbetter et al., 1990). Esta proteína contiene un dominio citoplasmático muy corto que no posee actividad señalizadora pero aumenta en varios órdenes de magnitud la afinidad del receptor por la IL-2, lo que permite la expansión de la población activada (Taniguchi and Minami, 1993). CD25 se regula a nivel transcripcional por varios factores que incluyen AP-1, NFAT y NF- κ B (Kim and Leonard, 2002). También posee sitios de unión para STAT5 lo que garantiza su expresión en respuesta a la propia IL-2 (Nakajima et al., 1997).

Las observaciones anteriores sugerían que la deficiencia de DGK α mimetiza en parte los requerimientos de la señal coestimuladora en la inducción de un gen regulado por Ras/ERK como CD69 en células CD8 (**Fig 11**). Por este motivo, decidimos estudiar si el efecto de la deficiencia de DGK α también afectaba a la inducción de CD25, que requiere de la implicación de más factores de transcripción. Para ello, células de ganglios WT y deficientes en DGK α se estimularon con anti-CD3 en presencia o ausencia de anti-CD28 y el inhibidor R59. Conforme al importante requerimiento de señales coestimuladoras para la expresión esta proteína, se observó que la estimulación del TCR en células T CD8 WT apenas indujo expresión de CD25 (**Fig 13 A izda**). Como para CD69, el tratamiento con el inhibidor de DGKs mimetizó la señal coestimuladora, sugiriendo de nuevo que la coestimulación inhibe la actividad DGK. El análisis de la expresión de CD25 en células CD8 deficientes para DGK α reveló una mayor inducción por la estimulación con anti-CD3 pero, a diferencia de lo observado para CD69, la diferencia en porcentaje observada con la coestimulación es muy grande (**Fig 13 A dcha**). Al igual que en las células WT, el tratamiento con el inhibidor de DGKs en las células CD8 deficientes para DGK α mimetizó la coestimulación, apuntando a la presencia de otras DGKs diferentes de DGK α , en la limitación de la inducción de CD25 por CD28. Al igual que para CD69, tanto el efecto del inhibidor de DGKs como el análisis de células deficientes en DGK α sugieren que la contribución de esta familia de enzimas es mucho menor en las células CD4 (**Fig 13 B**). A tiempo final (72 h) linfocitos CD8 y CD4 deficientes en DGK α expresan mayores niveles de CD25 tras la estimulación con CD3 aunque en ninguno de los dos casos se alcanzan los niveles inducidos por la coestimulación (**Fig 13 C**), sugiriendo una mayor influencia de la DGK α en la expresión de CD25 por CD3 y no por CD28.

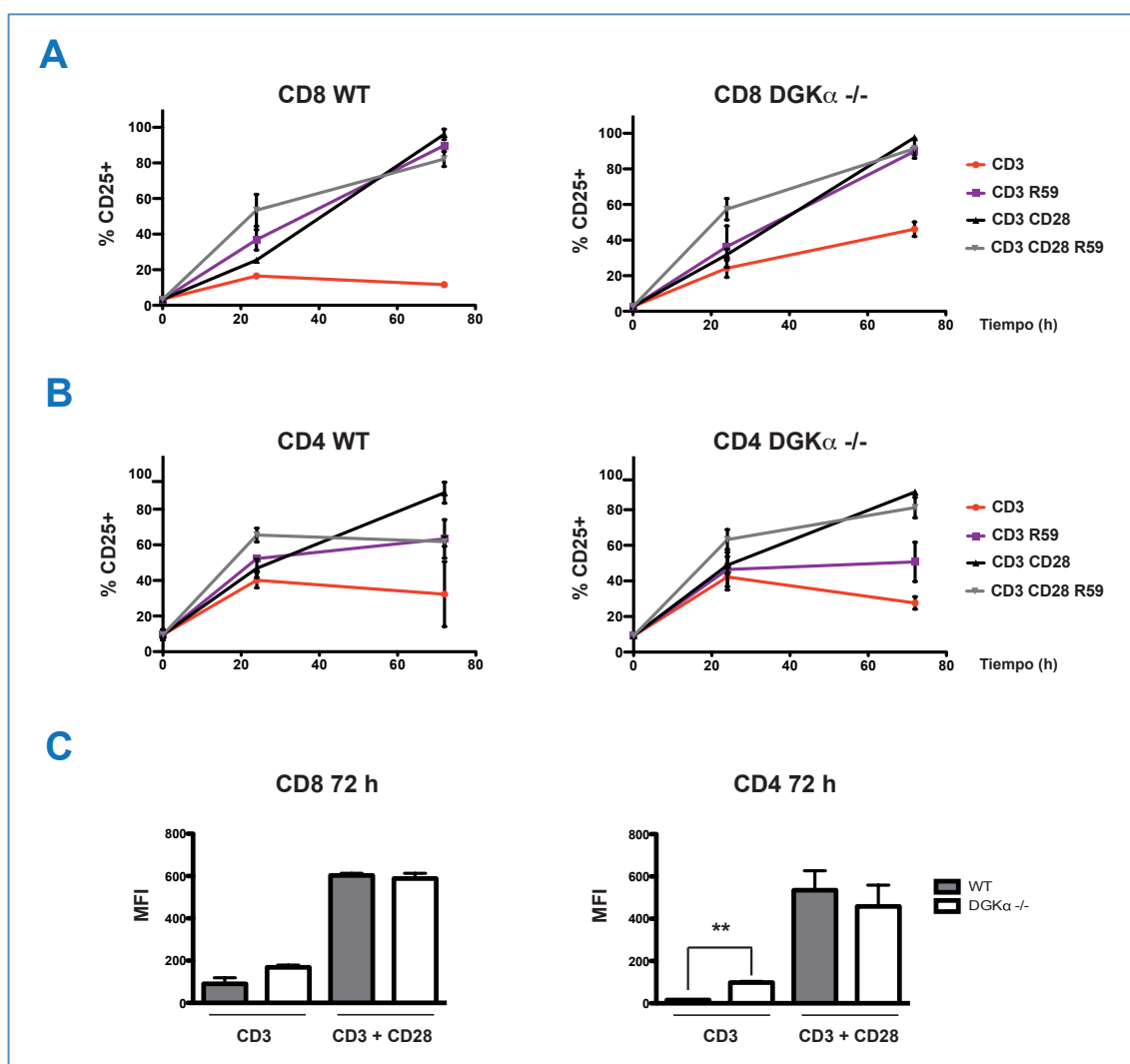


Figura 13. Papel de la DGK α en la expresión de la subunidad α del receptor de IL-2 (CD25). Células de ganglios de ratones WT y deficientes para DGK α fueron estimulados con anti-CD3 pegado a placa solo, junto con anti-CD28 soluble, el inhibidor de DGKs R59, o con ambos. La expresión en superficie de la subunidad α del receptor de IL-2, CD25, se determinó por citometría de flujo. **(A)** Porcentaje de células CD25+ en la población CD8 y **(B)** CD4 a lo largo del tiempo. **(C)** Cuantificación de la intensidad media de fluorescencia (MFI) de CD25 en CD4 y CD8 a las 72 h post-estimulación. Se realizaron 2 experimentos independientes con n=4 por grupo. Se aplicó una prueba t de Student donde *= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$ y ***= $p < 0,001$.

3.4 Contribución de la DGK α a la expresión de los marcadores metabólicos CD98 y CD71

La expansión clonal de los linfocitos en respuesta a la estimulación requiere de una rápida entrada en el ciclo celular, seguida de una rápida proliferación (con tiempos de duplicación de menos de cinco horas), con el objetivo de generar suficientes células efectoras en el menor tiempo posible (Abbas, 2003). La expresión de receptores para glucosa, aminoácidos esenciales y otros nutrientes permite la readaptación metabólica necesaria para sostener la expansión clonal (Fox et al., 2005). CD98 (SLC3A2) es un transportador de aminoácidos cuya expresión en superficie aumenta rápidamente tras la activación de las células T (Suomalainen,

1986). CD98 es un heterodímero formado por una cadena ligera que actúa como transportador de aminoácidos (Deves and Boyd, 2000) y una cadena pesada que se une a la cola citoplasmática de las integrinas tipo β (Miyamoto et al., 2003; Prager et al., 2007) y media señales de adhesión, supervivencia y crecimiento (Rintoul et al., 2002). Estudios en ratones deficientes para la cadena pesada de CD98 han demostrado la importancia de esta molécula en la expansión clonal (Cantor et al., 2011).

El receptor de transferrina (CD71) es otro marcador de activación metabólica cuya expresión en superficie también aumenta tras la activación (Pattanapanyasat and Hoy, 1991). La expresión en superficie de ambos receptores requiere de la coestimulación (Zheng et al., 2007b) y no es una consecuencia, sino un paso necesario para facilitar la activación (Fox et al., 2005). La expresión de ambos marcadores no se activa por la coestimulación en células anérgicas, lo que confirma la relevancia de la maquinaria metabólica para la activación de las células T (Zheng et al., 2009).

El análisis de la expresión de estos marcadores en linfocitos T confirmó que el porcentaje de linfocitos CD8 que expresan CD98 y CD71 tras la estimulación del TCR es muy bajo en ratones WT en ausencia de coestimulación (**Fig 14 A y C izda**). Por el contrario, se observó un mayor porcentaje de células que expresan estos marcadores en linfocitos CD8 deficientes en DGK α (**Fig 14 A y C dcha**) comparado con ratones WT. Sin embargo, con la coestimulación los efectos de la deficiencia de DGK α en células CD8 dejaron de apreciarse. Como en los anteriores marcadores, la deficiencia de DGK α apenas afectó a la expresión de estos marcadores en células CD4 (**Fig 14 B y D**).

3.5 Contribución de la DGK α a la proliferación inducida por IL-2.

La caracterización inicial de los ratones deficientes en DGK α reveló que sus células T proliferan de forma más robusta en respuesta a la estimulación de antígeno (Olenchok et al., 2006). Nuestros experimentos revelan una mayor inducción de CD25 tras la estimulación del TCR con anti-CD3 y mayor expresión de marcadores metabólicos, sugiriendo que la DGK α es un importante regulador de la señal proliferativa de la IL-2 en linfocitos CD8 (**Fig 13 C**).

Por ello, decidimos estudiar el impacto de la deficiencia de DGK α en la sensibilidad a la respuesta proliferativa de la IL-2. La estimulación de linfocitos T CD8 WT con anti-CD3 y anti-CD28 en ausencia de IL-2 exógena indujo una proliferación limitada (**Fig 15 A izda**). Los linfocitos deficientes para DGK α presentaron una proliferación mucho más robusta en ausencia de IL-2 exógena, sugiriendo una mayor sensibilidad a la IL-2 endógena tras la estimulación del TCR. A pesar de que el análisis de marcadores metabólicos no sugería un efecto similar en los linfocitos CD4 deficientes para DGK α , el análisis de su respuesta proliferativa reveló la existencia de una ventaja en su expansión en ausencia de IL-2 exógena (**Fig 15 A dcha**).

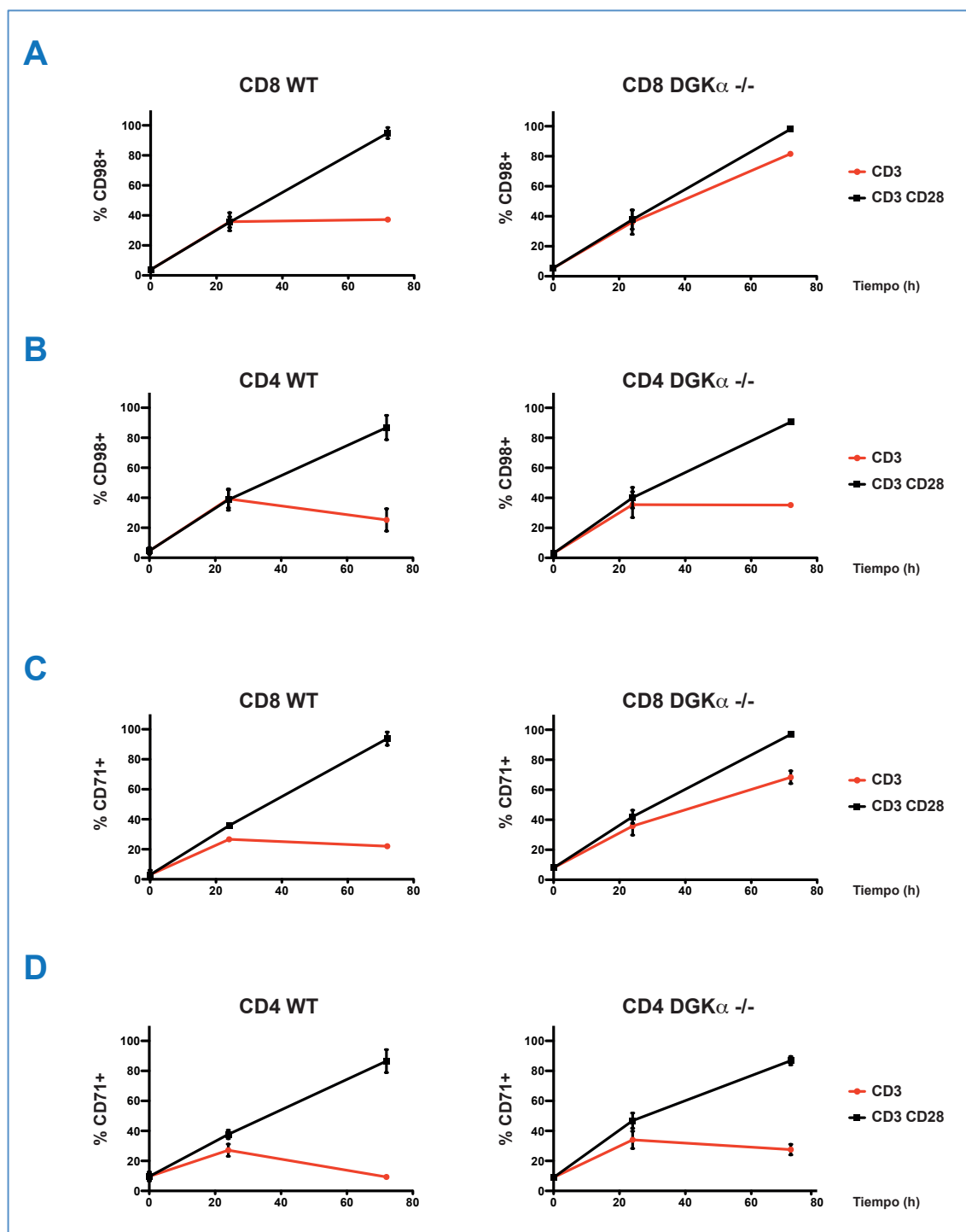


Figura 14. Papel de la DGK α en la expresión de los marcadores metabólicos CD98 y CD71. Células de ganglios de ratones WT y deficientes para DGK α fueron estimulados con anti-CD3 pegado a placa solo o junto con anti-CD28 soluble. La cantidad en superficie de CD98 y CD71 se determinó por citometría de flujo. **(A)** Porcentaje de células CD98+ en células CD8 y **(B)** CD4 a lo largo del tiempo. **(C)** Porcentaje de células CD71+ en células CD8 y **(D)** CD4 a lo largo del tiempo. Se realizaron 2 experimentos independientes con n=4 por grupo.

Sin embargo, al añadir IL-2 exógena las diferencias observadas entre los dos grupos tanto para CD4 como para CD8 fueron menores.

El locus Cd25 posee sitios de unión para STAT5, lo que favorece la expresión de CD25 en respuesta a la propia IL-2 (Nakajima et al., 1997). Para analizar la respuesta a la IL-2 en la

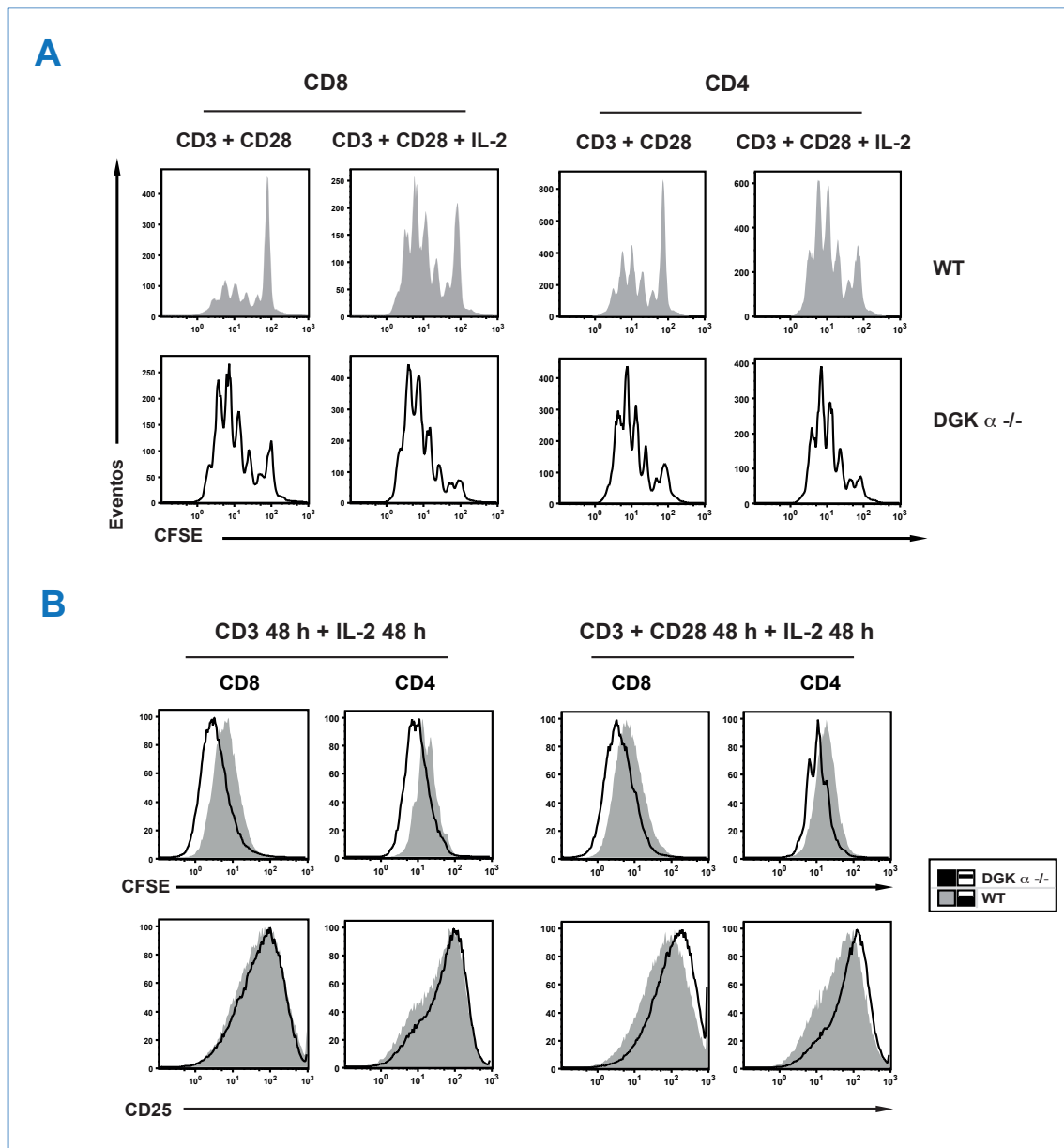


Figura 15. Respuesta proliferativa de los linfocitos T deficientes en DGK α tras la estimulación del TCR y la presencia de IL-2. Células T de ganglios de ratones WT y deficientes para DGK α fueron marcadas con CFSE y estimuladas con anti-CD3 pegado a placa solo o junto con anti-CD28 soluble, y en presencia o ausencia de IL-2. **(A)** Medida de la proliferación por dilución de CFSE tras estimulación completa del TCR en presencia o ausencia de IL-2 durante 72 h en las células CD4 y CD8. **(B)** Proliferación celular y expresión de CD25 tras estimulación primaria con anti-CD3 solo (izquierda) o en presencia de anti-CD28 (derecha) durante 48 h, posterior marcaje con CFSE y estimulación con IL-2 durante 48 h.

expansión de las células T efectoras tras la activación linfocitaria inicial, células T de ratones WT y deficientes para DGK α se diferenciaron mediante estimulación del TCR con anti-CD3 o con anti-CD3 y anti-CD28 durante 48 h, y posteriormente se les añadió la misma dosis de IL-2 exógena, midiendo su capacidad proliferativa tras 48 h de la adición de IL-2. Las células que no poseen DGK α mostraron una mejor respuesta a IL-2 (**Fig 15 B**), con una mayor expresión de CD25 y mayor dilución de CFSE independientemente del estímulo primario recibido. Estos experimentos sugieren que la DGK α actúa como un regulador negativo de la respuesta a la IL-2.

4. PAPEL DE LA DGK α EN LA RESPUESTA CITOTÓXICA

Los experimentos anteriores sugerían un papel primordial de la DGK α como regulador negativo de la activación en linfocitos T CD8. Para estudiar en mayor detalle la contribución de la DGK α en la respuesta de las células CD8, cruzamos los ratones deficientes en DGK α con el modelo OT-I. Estos ratones expresan un TCR transgénico OT-I (V α 2.1 V β 5.1) que reconoce un péptido derivado de la ovalbúmina en el contexto del MHC de clase I, dando lugar a una mayoría de linfocitos T CD8 en periferia. Este modelo permite investigar la respuesta a variantes del péptido agonista OVA (257-264) con diferentes afinidades por el TCR transgénico, que inducen diferentes grados de activación (Hogquist et al., 1994). Esta herramienta ha permitido examinar en detalle la contribución de la señalización de la ruta de Ras/ERK en la selección tímica (Daniels et al., 2006).

Primeramente analizamos las poblaciones en timo y periferia en estos ratones. Los ratones OT-I DGK $\alpha^{-/-}$ presentan una ligera disminución de la celularidad tímica (**Fig 16 A**) aunque las poblaciones no se ven alteradas (**Fig 16 B**). En periferia también se observó un descenso de la celularidad en ganglios (**Fig 17 A**), mientras que las poblaciones de células B se mantienen sin alteraciones (**Fig 17 B**). Sin embargo, observamos una disminución significativa en el número de linfocitos T CD8 (**Fig 17 C**). Un análisis más detallado dentro del compartimento CD8 reveló una disminución de la población *naïve* CD44⁺CD62L⁺ y un aumento de la población CD44⁺CD62L⁻ efectora (**Fig 17 D**), lo que podría sugerir una cierta activación homeostática de estas células. El análisis en bazo refleja una mayor celularidad en los ratones DGK $\alpha^{-/-}$ OT-I (**Fig 18A**). No se observaron cambios significativos en los porcentajes de las diferentes poblaciones B (**Fig 18 B**), y a pesar de la existencia de una ligera disminución del porcentaje de células CD8 en los ratones DGK $\alpha^{-/-}$ OT-I, el número total no se ve afectado (**Fig 18 C**), sin alteraciones de las proporciones *naïve* frente a memoria o efectoras (**Fig 18 D**).

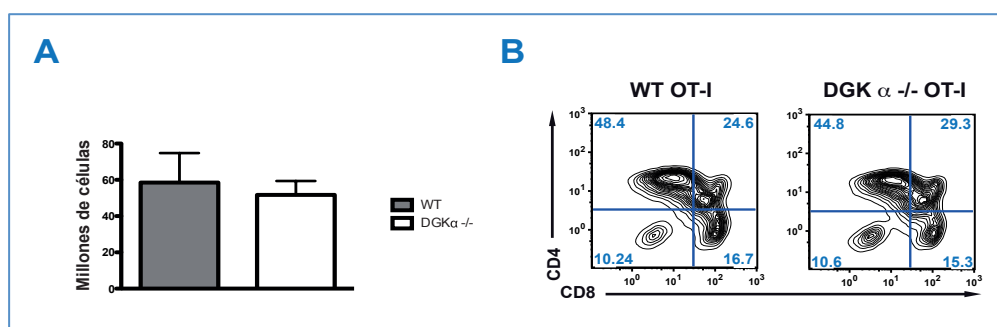


Figura 16. La deficiencia de DGK α no afecta al desarrollo tímico de los ratones OT-I. Análisis de los timos de ratones OT-I WT y deficientes en DGK α . **(A)** Número total de células (celularidad). **(B)** El porcentaje de las poblaciones CD4 y CD8 dentro del grupo de las células positivas para el TCR transgénico se determinó por citometría de flujo. n= 5 por grupo.

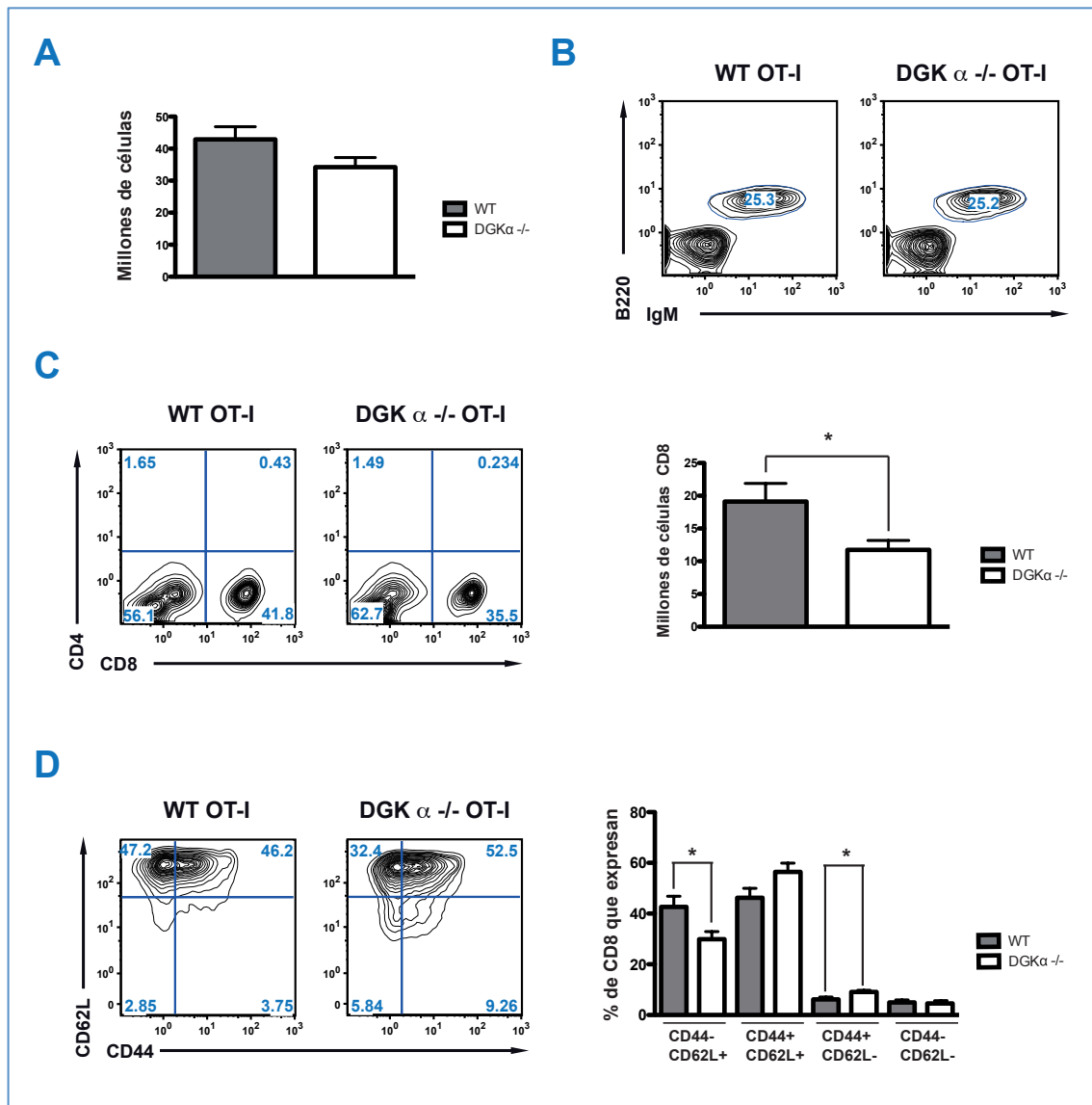


Figura 17. Análisis de las poblaciones de linfocitos T periféricos en ratones OT-I deficientes en DGK α . Análisis de los ganglios de ratones OT-I WT y deficientes en DGK α . **(A)** Número total de células (celularidad). **(B)** Porcentaje de células B tras tinción doble positiva para IgM y B220. **(C)** Porcentaje de células CD4 y CD8 (izquierda) y recuento de células CD8 (derecha). **(D)** Expresión de los marcadores CD62L y CD44 en las células CD8, y su cuantificación (derecha). n= 20 por grupo. Se aplicó una prueba t de Student donde *= $p<0,05$, **= $p<0,01$ y ***= $p<0,001$.

A continuación examinamos la respuesta a la estimulación de antígeno empleando dos péptidos con diferentes afinidades: uno derivado de OVA, (SIINFEKL), con alta afinidad por el TCR (K_d 3.7 nM) y otro de baja afinidad Q4H7 (SIQFEHL, K_d 51 nM) que produce una activación débil de la ruta Ras/ERK (Daniels et al., 2006). Tras comprobar que no existen diferencias en expresión de CD69 y CD25 en estado basal (**Fig 19 A**), se analizó la inducción de los marcadores de activación CD69 y CD25 tras la estimulación. Observamos mayor inducción temprana de CD69 en las células CD8 DGK α ^{-/-} OT-I tras la estimulación con el péptido de alta afinidad (OVA), diferencia no tan marcada al analizarse a tiempos más largos. La activación con el péptido de baja afinidad (Q4H7) mostró una menor inducción de CD69 en ambos grupos comparado con los estimulados con OVA, pero se mantuvo una ventaja en los OT-I DGK α ^{-/-},

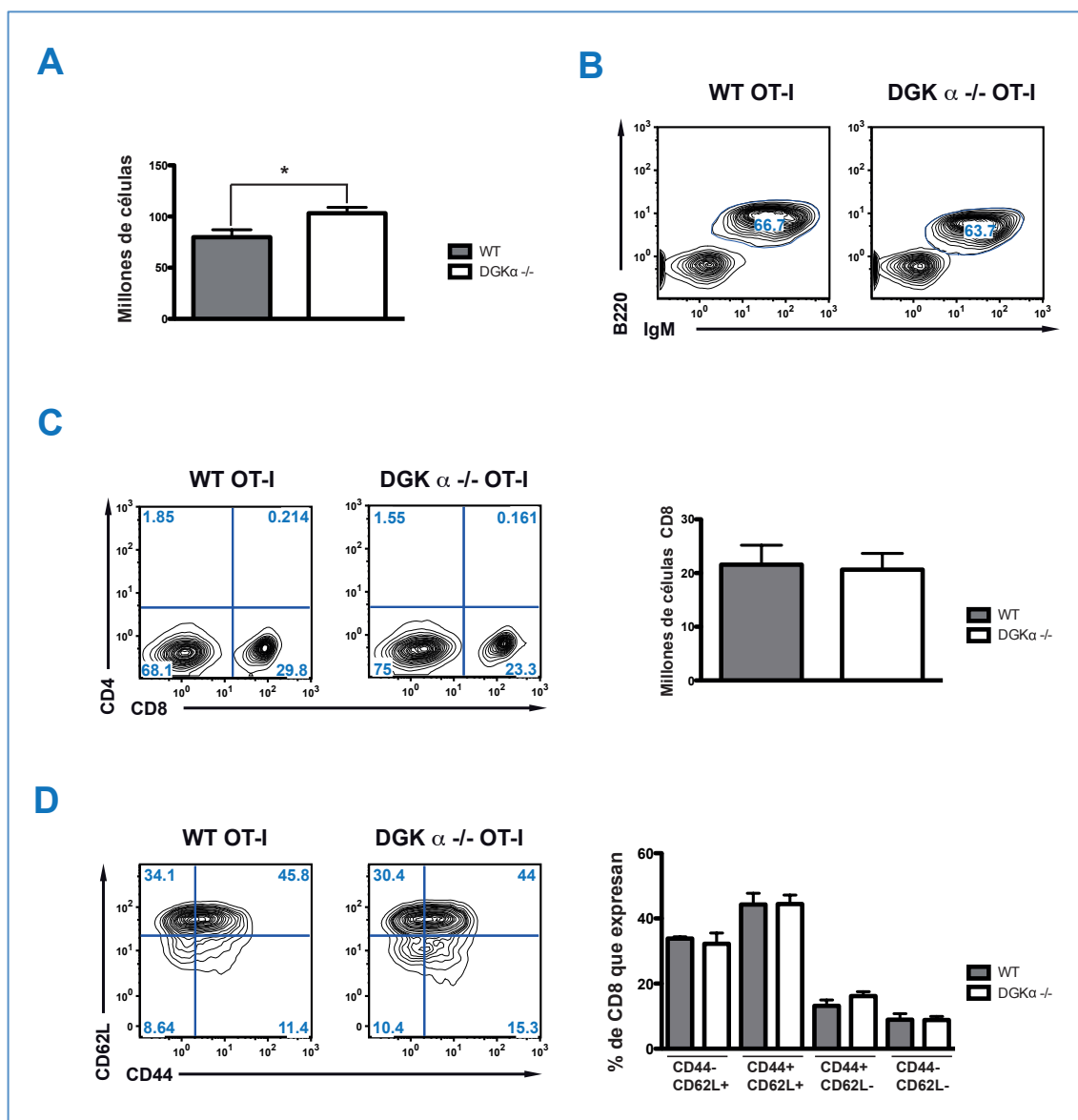


Figura 18. Análisis de las poblaciones esplénicas de los ratones OT-I deficientes en DGKα. Análisis de los bazo de ratones OT-I WT y deficientes para DGKα. **(A)** Número total de células (celularidad). **(B)** Porcentaje de células B tras tinción doble positiva para IgM y B220. **(C)** Porcentaje de células CD4 y CD8 (izquierda) y recuento de células CD8 (derecha). **(D)** Expresión de los marcadores CD62L y CD44 en las células CD8, y su cuantificación (derecha). n= 20 por grupo. Se aplicó una prueba t de Student donde *= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$ y ***= $p < 0,001$.

siendo la diferencia más sostenida en el tiempo. Se observó una ligera ventaja en expresión de CD25 por la deficiencia de DGKα en las primeras horas tras la estimulación con OVA, siendo poco patente tras 20 h de estimulación. Sin embargo, al estimular con Q4H7 se observaron mayores diferencias en expresión de CD25 tras la estimulación, observándose aún las diferencias tras 20 h de estimulación (**Fig 19 B**). Estos datos confirman lo mostrado anteriormente e indican que la DGKα regula negativamente la intensidad de estimulación del TCR.

A continuación analizamos la contribución de la DGKα durante la diferenciación citotóxica, analizando la expresión de marcadores de activación a tiempos más largos de estimulación. Al igual que lo descrito anteriormente, los linfocitos CD8 OT-I DGKα^{-/-}

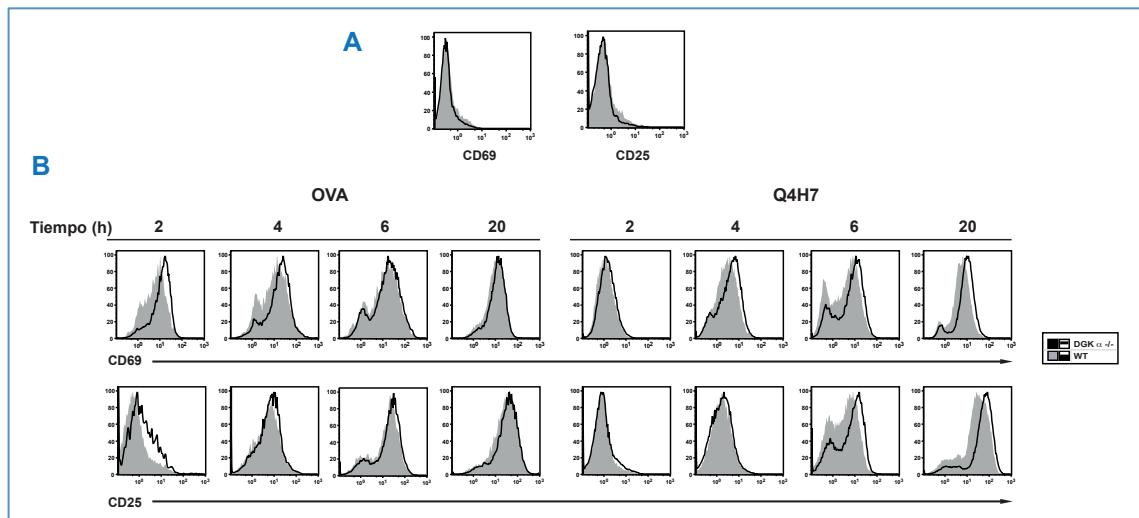


Figura 19. Determinación de la sensibilidad a la estimulación del TCR de las células T CD8 deficientes en *DGKα*. Células de ganglio de ratones OT-I WT y deficientes en *DGKα* se estimularon con los péptidos de alta afinidad (SIINFEKL, OVA) y afinidad baja (SIQFEHL, Q4H7) durante los tiempos indicados. La expresión de los marcadores de activación CD25 y CD69 se midió por citometría de flujo. Se realizaron 2 experimentos independientes con n=3 individuos por grupo.

expresaron mayores niveles de CD71 y CD25 tras la estimulación con OVA que los CD8 OT-I WT (**Fig 20 A**), confirmando una mejor respuesta a la activación antigénica. La expresión de CD25 sin embargo era menos sostenida en los ratones deficientes en *DGKα*, sugiriendo un consumo más rápido de la IL-2 secretada o una menor secreción.

En el análisis de la expresión de CD98 y CD62L, cuya expresión aumenta y disminuye respectivamente durante la diferenciación a CTLs (**Fig 20 B**) reveló la existencia de una ventaja metabólica reflejada en la expresión de CD98. Sin embargo, esta ventaja no variaba en gran medida al modificar el grado de afinidad por el TCR. Se observó además una mayor proteólisis de CD62L a las 24 h con los dos péptidos, mientras que las diferencias en los niveles de CD62L resultaron más obvias a tiempos largos, probablemente debido a una mayor sensibilidad a la IL-2 producida. Tras 72 h de estimulación con el péptido de baja afinidad la diferencia en expresión de CD62L entre los dos grupos era mayor que la observada con OVA, confirmando una mayor sensibilidad de las células deficientes en *DGKα* frente a un estímulo débil del TCR.

Tras su activación, los linfocitos T CD8 diferencian a CTLs en un programa regulado por la IL-2, mediante la activación de PI3K/AKT (Macintyre et al., 2011). La contribución de la *DGKα* como regulador negativo siempre se ha examinado en el contexto de las señales de activación, por lo que decidimos examinar su contribución a las señales de diferenciación reguladas por la IL-2. En primer lugar analizamos la regulación transcripcional de la *DGKα* durante la diferenciación hacia una población T citotóxica. La expresión de *Dgka* se determinó por PCR cuantitativa en linfocitos CD8 de ratones OT-I WT estimulados con OVA durante 48 h y posteriormente con IL-2. La expresión de *Dgka* disminuyó tras el tratamiento con OVA, confirmando su regulación transcripcional por señales fuertes del TCR (**Fig 21 A**).

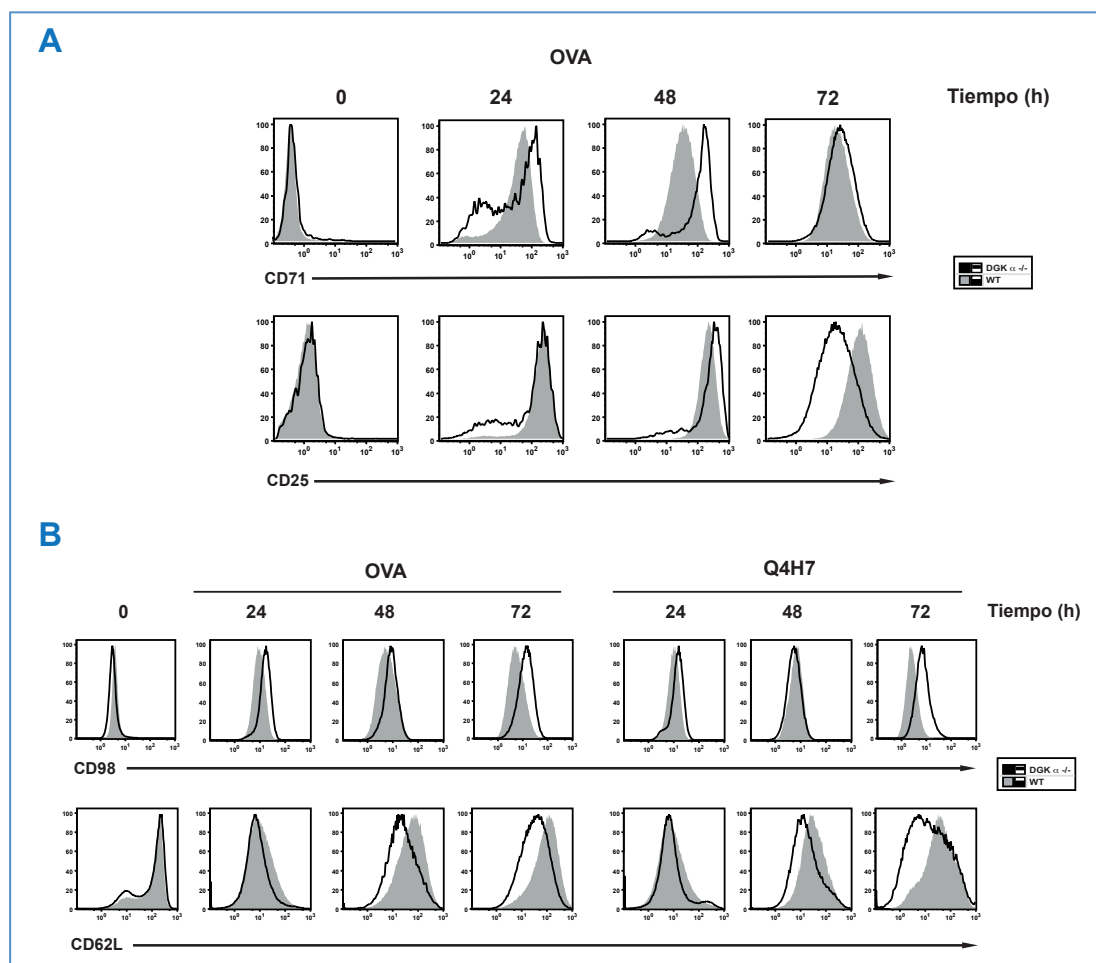


Figura 20. Implicación de la intensidad de señal del TCR y la deficiencia de DGK α en la diferenciación a células citotóxicas. Células de ganglio de ratones OT-I WT y deficientes en DGK α se estimularon con los péptidos de alta afinidad (SIINFEKL, OVA) y afinidad baja (SIIQFEHL, Q4H7) durante los tiempos indicados. **(A)** Expresión de los marcadores CD71 y CD25 en células CD8 tras estimulación con OVA. **(B)** Expresión de los marcadores CD98 y CD62L en células CD8 tras estimulación con OVA y Q4H7. Se realizaron 2 experimentos independientes con n=4 por grupo.

Sin embargo, las células que no fueron estimuladas con IL-2 recuperaron una expresión de *Dgka* cercana a los niveles basales, mientras que la disminución de *Dgka* se mantenía tras 48 h de activación por IL-2, recuperando su expresión en parte a las 96 h. (**Fig 21 A**). Estos experimentos demuestran que la IL-2 contribuye a la regulación negativa de la expresión de *Dgka*.

Tras confirmar la regulación de la DGK α en este sistema, decidimos estudiar su influencia en la expresión de moléculas reguladas por la IL-2 en la determinación del programa citotóxico, y la secreción de citoquinas en este proceso. Para ello analizamos por PCR cuantitativa la regulación de dos marcadores de diferenciación a CTLs como son la L-Selectina (CD62L, *Sell*) (Yang et al., 2011a) y Perforina (*Prf1*) (Kagi et al., 1994) durante la diferenciación a CTLs con OVA e IL-2. La expresión de *Sell* disminuyó en la diferenciación a células citotóxicas, siendo acelerada por la deficiencia de DGK α (**Fig 21 B**). En relación a *Prf1* no se observaron diferencias significativas entre los dos grupos tras la activación con OVA, lo cual es debido a que las células CD8 no expresan *Prf1* hasta que no se han diferenciado

terminalmente a células citotóxicas, evento regulado por la IL-2 (Janas et al., 2005). La expresión incrementada de *Prf1* en las células deficientes para *DGKα* tras 96 horas en presencia de IL-2 sugiere una respuesta citotóxica favorecida por la deficiencia de esta enzima.

Observando este patrón de respuesta a la IL-2 decidimos analizar si en la diferenciación a CTLs con OVA la deficiencia de *DGKα* afecta al patrón de producción de citoquinas.

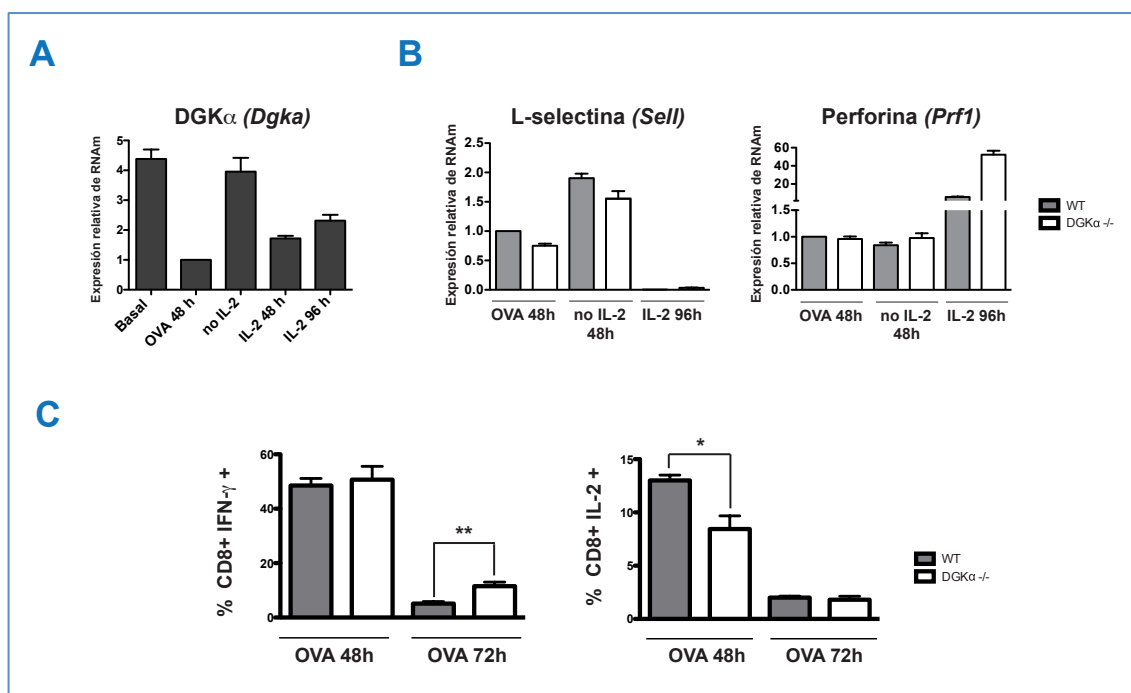


Figura 21. Una señal de activación fuerte del TCR o la IL-2 disminuyen la expresión de *DGKα* y dan lugar a un fenotipo más citotóxico. Se aislaron células CD8 de ratones OT-I WT y deficientes en *DGKα*. **(A)** Análisis de expresión por PCR cuantitativa de los niveles de *Dgka* en células CD8 WT en estado basal, tras la estimulación con OVA y rondas de IL-2 durante los tiempos indicados. **(B)** Expresión por PCR cuantitativa de *Sell* y *Prf1* en las células CD8 aisladas de ratones OT-I WT y deficientes en *DGKα* tras estimulación como en A. **(C)** Porcentaje de células CD8 positivas para la expresión de IFN-γ e IL-2 tras 48 y 72 h de estimulación con OVA. Se realizaron 2 experimentos independientes con n=4 individuos por grupo. Se aplicó una prueba t de Student donde *= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$ y ***= $p < 0,001$.

El análisis de producción de citoquinas reveló un incremento significativo en la producción de IFN-γ tras 72 h de estímulo con OVA, pero una menor producción de IL-2 a las 48 h por parte de los linfocitos CD8 OT-I *DGKα*^{-/-} (**Fig 21 C**). Los ratones OT-I *DGKα*^{-/-} presentan mayor producción de IFN-γ incluso en condiciones de menor secreción de IL-2, sugiriendo una regulación negativa por parte de la *DGKα* de las señales reguladas por esta citoquina.

5. PAPEL DE LA *DGKα* EN LA RESPUESTA ANTITUMORAL

Experimentos recientes han demostrado que linfocitos CD8 purificados de carcinoma renal expresan altos niveles de *DGKα* y tras la inhibición farmacológica de su actividad o la

adición de IL-2 recuperan la capacidad de secretar gránulos líticos, volviendo a obtener un fenotipo citotóxico (Prinz et al., 2012). Además, *Dgka* es un gen inducido en anergia (Macian et al., 2002), fenómeno que se genera de manera temprana en el microambiente tumoral (Staveley-O'Carroll et al., 1998). Todos estos estudios sugieren que los linfocitos CD8 deficientes en $DGK\alpha$ deberían de ser más resistentes a la anergia y presentar mayor actividad citotóxica frente a tumores. Por ello, y tras comprobar *in vitro* que la deficiencia de la $DGK\alpha$ potencia el programa citotóxico, decidimos investigar la capacidad antitumoral de los ratones deficientes en esta enzima.

Existen modelos específicos de respuesta CD8 frente a tumores como los que utilizan la inoculación de la línea EG.7, línea tumoral procedente de una modificación del timoma EL4 que expresa el péptido de alta afinidad por el TCR OVA (Moore et al., 1988). Este modelo se ha empleado previamente para demostrar una respuesta antitumoral aumentada en ratones OT-I deficientes para $DGK\zeta$ (Riese et al., 2011). Sin embargo, decidimos descartarlo tras la observación de que una estimulación fuerte y/o la coestimulación inhiben transcripcionalmente la $DGK\alpha$. En nuestro modelo precisábamos de una situación en la que se garantizase la inducción de un fenotipo anérgico en la población CD8. Como alternativa decidimos elegir la línea tumoral EL4, timoma que no expresa ni CD4, ni CD8 (Gays et al., 2000) ni las proteínas implicadas en la coestimulación por CD28, B7.1 y B7.2 (Yu et al., 1998), por lo que la intensidad de la coestimulación proporcionada es baja. Además, es un modelo utilizado en ratones deficientes para otros genes relacionados con la anergia, que poseen respuesta efectora incrementada frente a tumores, ya sean inducidos intraperitonealmente o subcutáneamente (Chiang et al., 2007; Wohlfert et al., 2006).

Las células tumorales se inocularon intraperitonealmente en los ratones WT y deficientes para $DGK\alpha$ y se monitorizó la supervivencia de los ratones (**Fig 22 A**), observando una disminución considerable de la supervivencia de los ratones $DGK\alpha^{-/-}$. El análisis tras la eutanasia reveló una profunda disminución en la celularidad del bazo en los ratones $DGK\alpha^{-/-}$ frente a los WT (**Fig 22 B**), así como un elevado desarrollo tumoral (**Fig 22 C**). Estos resultados eran contrarios a los esperados, y sugerían una inhibición de la respuesta citotóxica relacionada con la deficiencia de la $DGK\alpha$. Decidimos emplear un modelo que nos permitiera analizar los infiltrados tumorales de una manera más precisa, por lo que decidimos realizar la inoculación subcutánea. Se inocularon las células EL4 en el flanco derecho de los ratones WT y $DGK\alpha^{-/-}$ y se monitorizó el volumen de los tumores a los 21 días, observándose mayor crecimiento de los tumores en los ratones $DGK\alpha^{-/-}$ (**Fig 23 A**). Se observó además un mayor peso del tumor en los ratones deficientes para $DGK\alpha$, (**Fig 23 B**) correlacionado con un mayor tamaño a tiempo final del experimento (**Fig 23 C**). Además, se observó una ligera disminución en la celularidad del bazo de los ratones deficientes para $DGK\alpha$ comparado con los ratones WT (**Fig 23 D**).

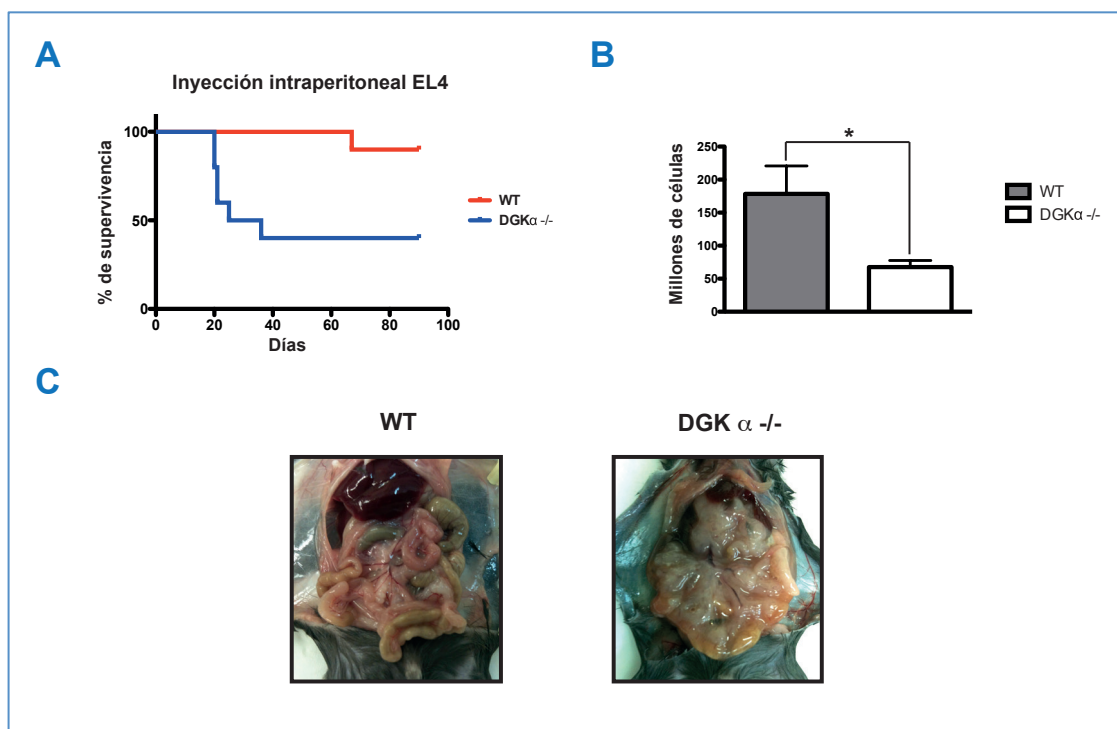


Figura 22. La deficiencia de DGKα lleva a un mayor desarrollo de tumores intraperitoneales EL4. Ratones WT y deficientes en DGKα fueron inoculados intraperitonealmente con $2,5 \times 10^6$ células EL4. **(A)** Monitorización de la supervivencia tras la inyección intraperitoneal, representando los datos de un experimento representativo con una curva de Kaplan-Meier, aplicando el Log-Rank Test y obteniendo $p < 0,05$. **(B)** Cuantificación de la celularidad del bazo de los ratones a día del sacrificio. **(C)** Desarrollo intraperitoneal del tumor en los ratones a día de la muerte o final del experimento. Se realizaron 3 experimentos independientes con $n=5$ por grupo.

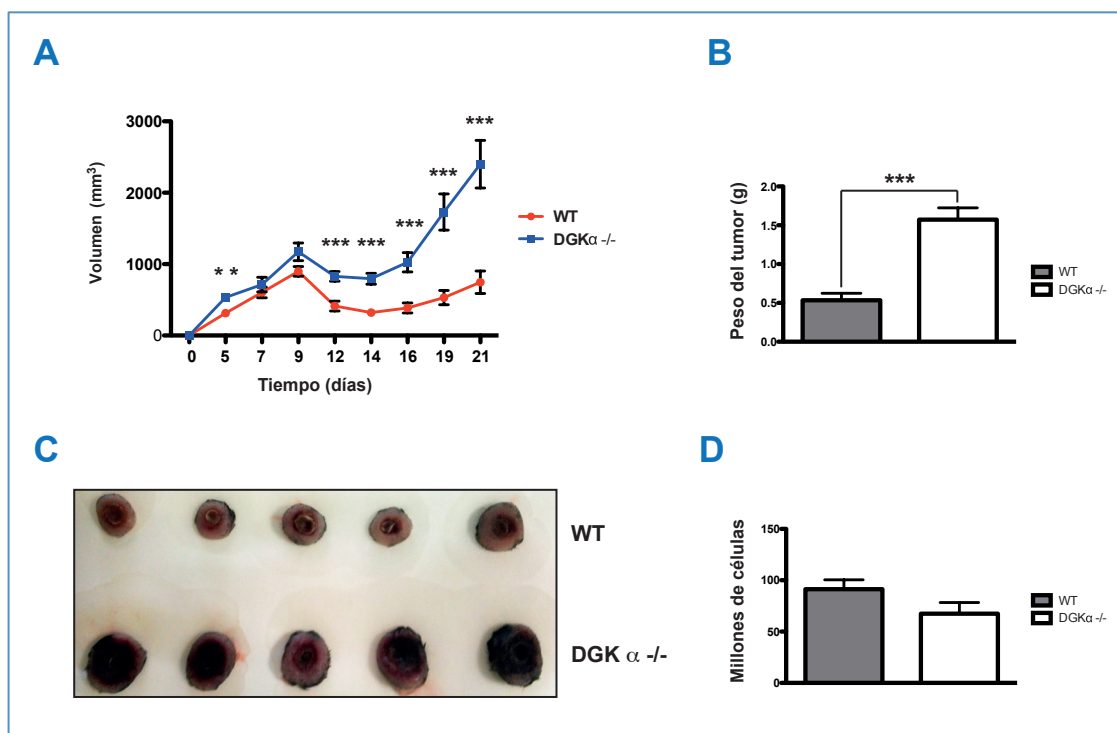


Figura 23. La deficiencia de DGKα lleva a un mayor desarrollo de tumores subcutáneos EL4. Ratones WT y deficientes en DGKα fueron inoculados subcutáneamente con $2,5 \times 10^6$ células EL4. **(A)** Monitorización del crecimiento del tumor por medida de su volumen. **(B)** Medida del peso del tumor a día 21. **(C)** Imagen de los tumores de un experimento representativo a día 21. **(D)** Celularidad del bazo a día 21. Se aplicó una prueba t de Student donde $*=p < 0,05$, $**=p < 0,01$ y $***=p < 0,001$.

Resultados

Para profundizar en el estudio de la respuesta inmune frente al tumor se analizó el infiltrado leucocitario tumoral existente. Se observó una mayor infiltración de células mieloides y células T en los ratones $DGK\alpha^{-/-}$, sin apenas cambios en el infiltrado de células dendríticas y células B (**Fig 24 A y B**).

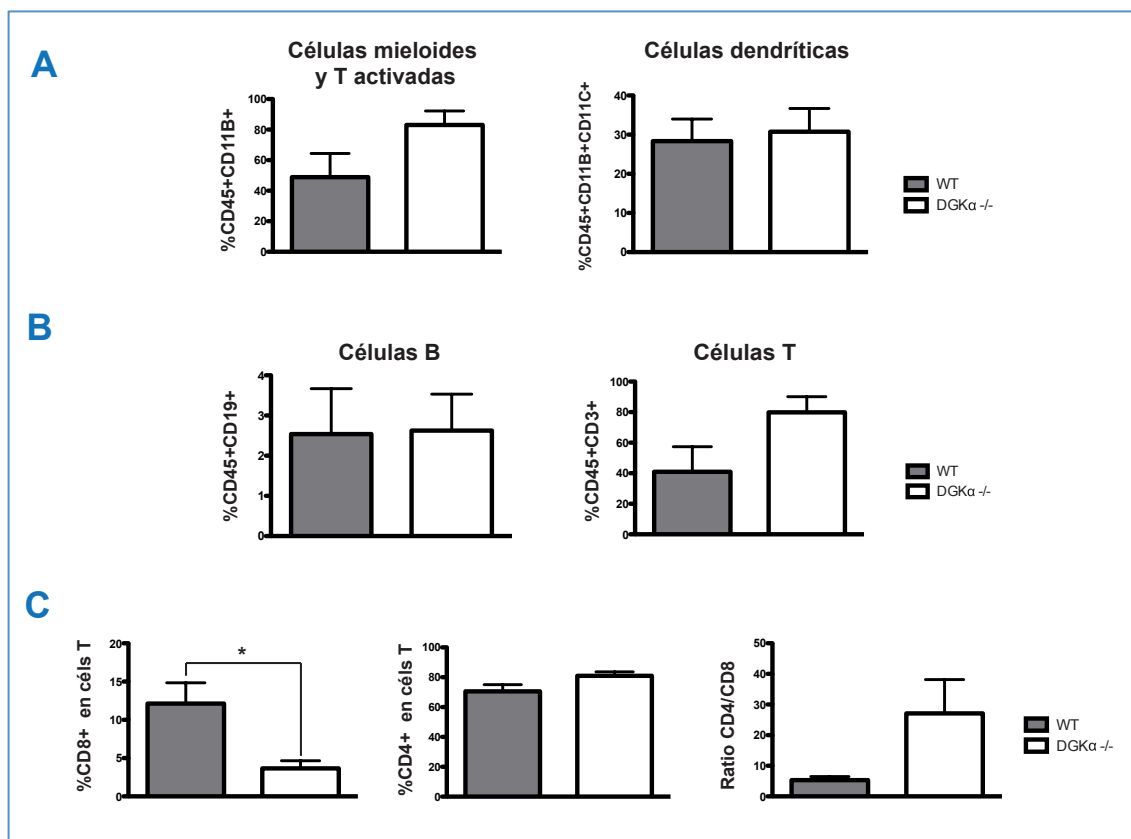


Figura 24. Caracterización del infiltrado leucocitario intratumoral a día 21 tras la inoculación del tumor subcutáneo EL4. Se determinó el infiltrado leucocitario tras disgregación de los tumores en ratones WT y deficientes en $DGK\alpha$ y posterior tinción con anticuerpos específicos para su análisis por citometría de flujo. **(A)** Cuantificación del porcentaje de células mieloides y T activadas ($CD45^+CD11B^+$), dendríticas ($CD45^+CD11B^+CD11C^+$), células B ($CD45^+CD19^+$). **(B)** Cuantificación del porcentaje de células y T ($CD45^+CD3^+$) y dentro de población T el porcentaje de células CD4 y CD8 y ratio CD4/CD8 **(C)**. Se realizaron 2 experimentos independientes con n=5 por grupo. Se aplicó una prueba t de Student donde *= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$ y ***= $p < 0,001$.

Además, se observó una disminución significativa en los porcentajes de células T CD8 infiltradas en el tumor en los ratones deficientes en $DGK\alpha$, sin cambios en las CD4, traduciéndose en un mayor ratio de CD4/CD8 (**Fig 24 C**). El análisis del infiltrado CD8 en los tumores de ratones $DGK\alpha^{-/-}$ reveló una marcada disminución en la expresión del marcador de activación CD44 (**Fig 25 A**). La población de células CD8 $DGK\alpha^{-/-}$ con baja expresión de CD44, eran en su mayoría positivas para la expresión de CD62L y CD127 (**Fig 25 B**), sugiriendo que se trataba de células que no habían respondido al antígeno. El análisis de la población CD8 con alta expresión de CD44 también reveló importantes diferencias entre los ratones WT y los $DGK\alpha^{-/-}$. Mientras que en los ratones WT predominaba una población

CD127⁺CD62L⁻, característica de una población Tem, los linfocitos CD8 infiltrados en los tumores en los ratones deficientes para la DGK α , presentaban un fenotipo CD127⁺CD62L⁺,

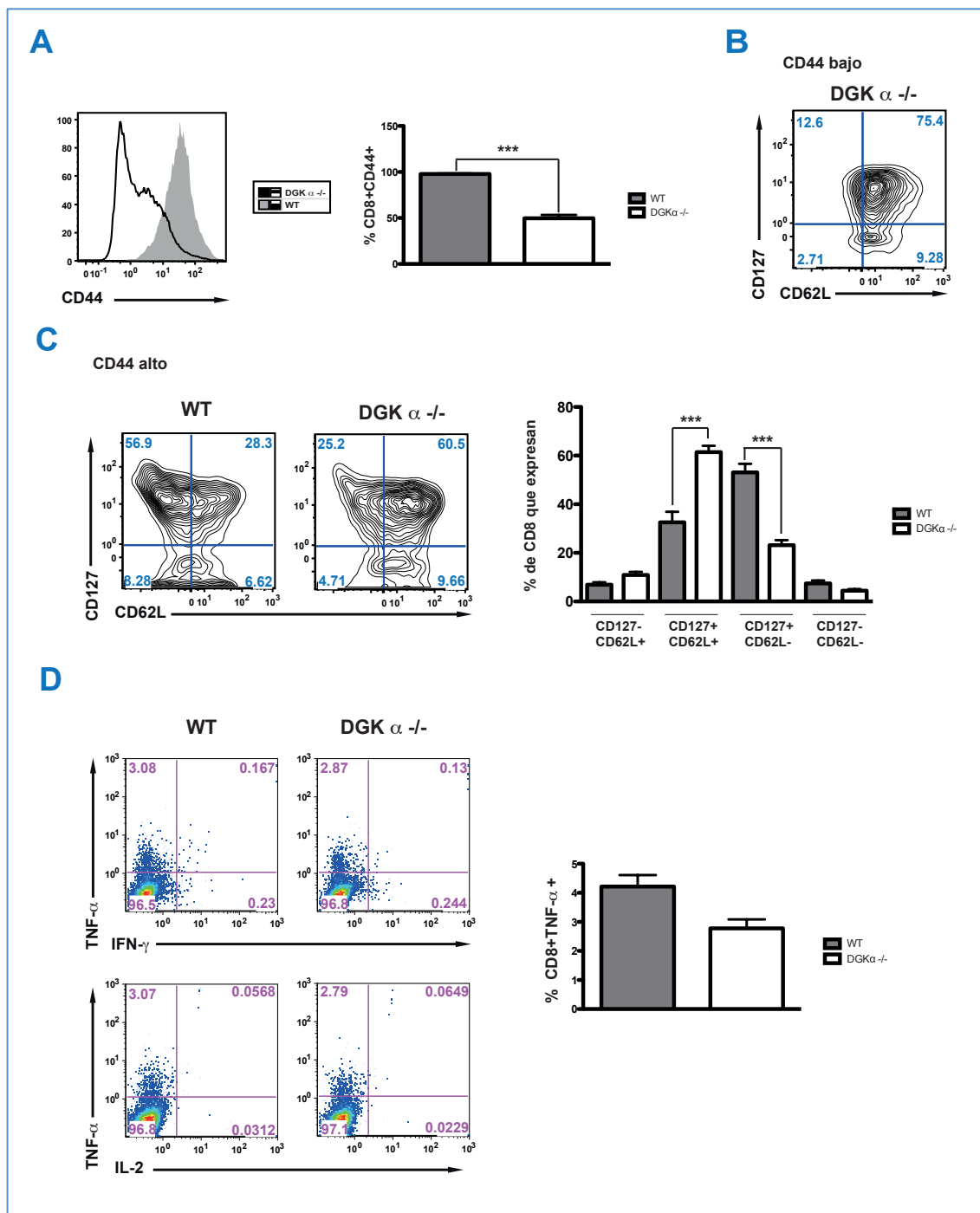


Figura 25. Análisis fenotípico de los linfocitos T CD8 infiltrados en el tumor subcutáneo EL4 a día 21 tras la inoculación. Se midió la expresión de marcadores de activación y citoquinas expresadas en los linfocitos T CD8 infiltrados del tumor subcutáneo EL4 a día 21 tras la inoculación en ratones WT y deficientes en DGK α (**A**) Medida de expresión de CD44 (izquierda), y cuantificación del porcentaje de células CD44+ (derecha). (**B**) Expresión de los marcadores CD62L y CD127 en las células CD8 con nivel bajo de expresión de CD44 de los ratones deficientes para DGK α . (**C**) Expresión de los marcadores CD62L y CD127 en las células CD8 con alto nivel de expresión de CD44 (izquierda) y su cuantificación (derecha). (**D**) Medida de expresión de TNF- α , IL-2 e IFN- γ (izquierda) y cuantificación de las que expresan TNF- α (derecha). Se realizaron 3 experimentos independientes con n=5 por grupo. Se aplicó una prueba t de Student donde *= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$ y ***= $p < 0,001$.

más característico de poblaciones Tcm (**Fig 25 C**), sugiriendo quizás que las células CD127⁺CD62L⁻ observadas en el WT sean las que están en respuesta activa frente al tumor. Respecto a las citoquinas producidas por las células CD8 en el tumor, no se pudo detectar producción significativa de IFN- γ , IL-2 y la producción de TNF- α era muy baja en ambos grupos, viendo a pesar de ello una producción de TNF- α disminuida por parte de las células CD8 de los ratones DGK α ^{-/-} (**Fig 25 D**). El análisis de los infiltrados correlacionaba con el mayor tamaño de los tumores, que junto con la ausencia prácticamente total de poblaciones CD8 en los tumores de ratones DGK α ^{-/-} y la deficiente respuesta inmune de las células CD8 DGK α ^{-/-} presentes, sugería que la respuesta CD8 a tumores estaba totalmente disminuida por la deficiencia de DGK α .

La activación y diferenciación a memoria de las células CD8 depende en gran medida de la población CD4, por lo que analizamos en detalle esta población. Aunque mucho menos dramático que en la población CD8, el análisis de los infiltrados tumorales reveló una menor expresión de CD44 (**Fig 26 A**). Dentro de la población con alta expresión de CD44 se observó que en ambos casos la mayoría de las células presentaban un fenotipo CD127⁺CD62L⁻, con una disminución significativa de esta población en los tumores de ratones DGK α ^{-/-} (**Fig 26 B**). Se observó además una disminución en la expresión de citoquinas Th1 como TNF- α , IFN- γ e IL-2 por parte de las CD4 DGK α ^{-/-} en el infiltrado tumoral, sugiriendo una menor respuesta frente al tumor de las células CD4 deficientes en DGK α (**Fig 26 C**).

Otra población T que determina el grado de respuesta al tumor son las Treg, ya que la inhibición de la respuesta inmune antitumoral se debe en gran medida a la aparición en el microambiente tumoral de poblaciones con actividad reguladora (Clarke et al., 2006), por lo que decidimos estudiar el infiltrado de Treg. El análisis de la población CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ intratumoral reveló un porcentaje similar de células CD4⁺CD25⁺ (**Fig 27 A**), pero una expresión alterada de FOXP3 en los ratones DGK α ^{-/-}. Mientras que las células CD4⁺CD25⁺ en el ratón WT mostraban una expresión uniforme de FOXP3, en los ratones DGK α ^{-/-} se observaron dos poblaciones con niveles respectivamente más altos y más bajos de FOXP3 que los existentes en la población WT (**Fig 27 B**), sugiriendo una alteración en la población reguladora infiltrada en el tumor.

Junto con el análisis del infiltrado tumoral, analizamos el bazo para determinar si las alteraciones observadas eran o no específicas del microambiente tumoral. Los bazos de ratones DGK α ^{-/-} presentaban menor número de linfocitos CD8 (**Fig 28 A**), aunque el porcentaje de células CD8 CD44⁺ era similar en ambos tipos de ratones (**Fig 28 B**), sugiriendo que el fenotipo observado en el tumor es resultado del microambiente tumoral. La población con alta expresión de CD44 no presentaba grandes alteraciones entre los dos grupos, con una ligera disminución en el porcentaje de células efectoras (CD127⁻CD62L⁻), (**Fig 28 C**), y un ligero aumento de expresión de CD25 en los ratones DGK α ^{-/-} (**Fig 28 D**).

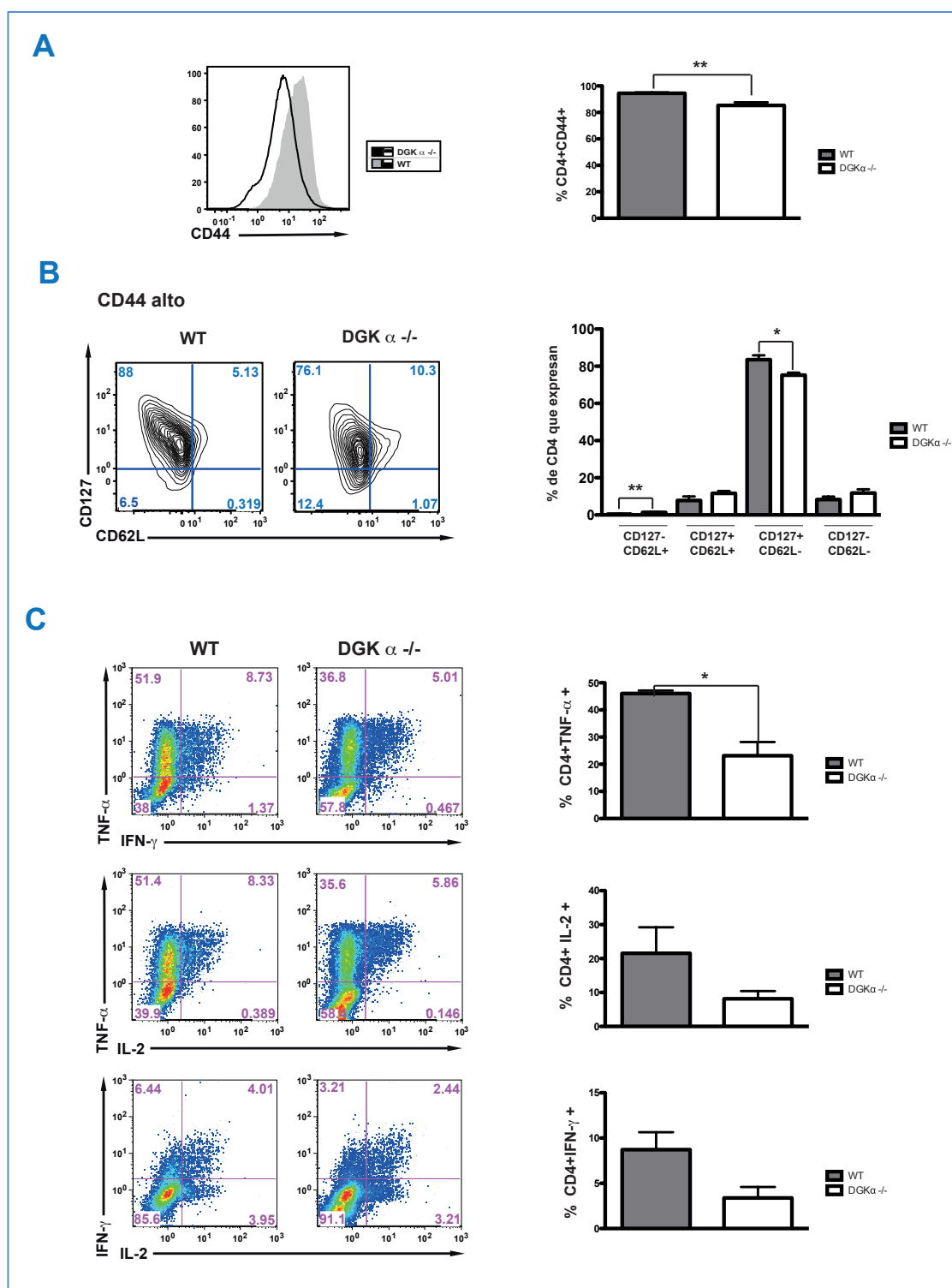


Figura 26. Análisis fenotípico de los linfocitos T CD4 infiltrados en el tumor subcutáneo EL4 a día 21 tras la inoculación. Se midió la expresión de marcadores de activación y citoquinas expresadas en los linfocitos T CD4 infiltrados del tumor subcutáneo EL4 a día 21 tras la inoculación en ratones WT y deficientes en DGKα. **(A)** Expresión de CD44 (izquierda), y cuantificación del porcentaje de células CD44⁺ (derecha). **(B)** Expresión de los marcadores CD62L y CD127 en las células CD4 con alto nivel de expresión de CD44 (izquierda) y su cuantificación (derecha). **(C)** Medida de expresión de TNF-α, IL-2 e IFN-γ (izquierda) y su cuantificación (derecha). Se realizaron 3 experimentos independientes con n=5 por grupo. Se aplicó una prueba t de Student donde *= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$ y ***= $p < 0,001$.

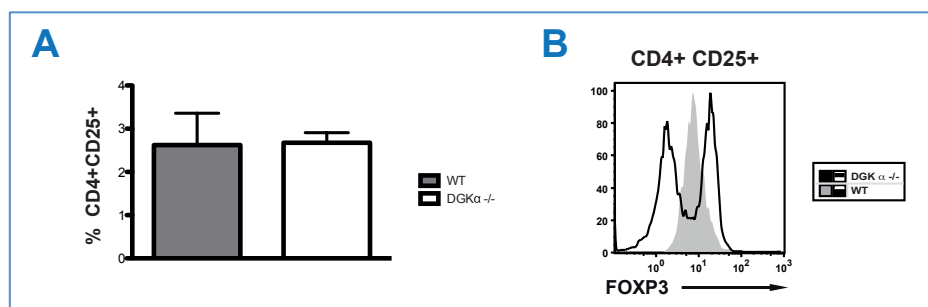


Figura 27. La deficiencia de DGKα lleva a una expresión alterada de FOXP3 en las células T CD4 infiltradas en el tumor subcutáneo EL4 a día 21 tras la inoculación. **(A)** Cuantificación del porcentaje de células CD4 que expresan CD25 en el infiltrado tumoral de los ratones WT y deficientes para DGKα. **(B)** Expresión de FOXP3 dentro de la población CD4⁺CD25⁺. Se realizaron 3 experimentos independientes con n=5 por grupo.

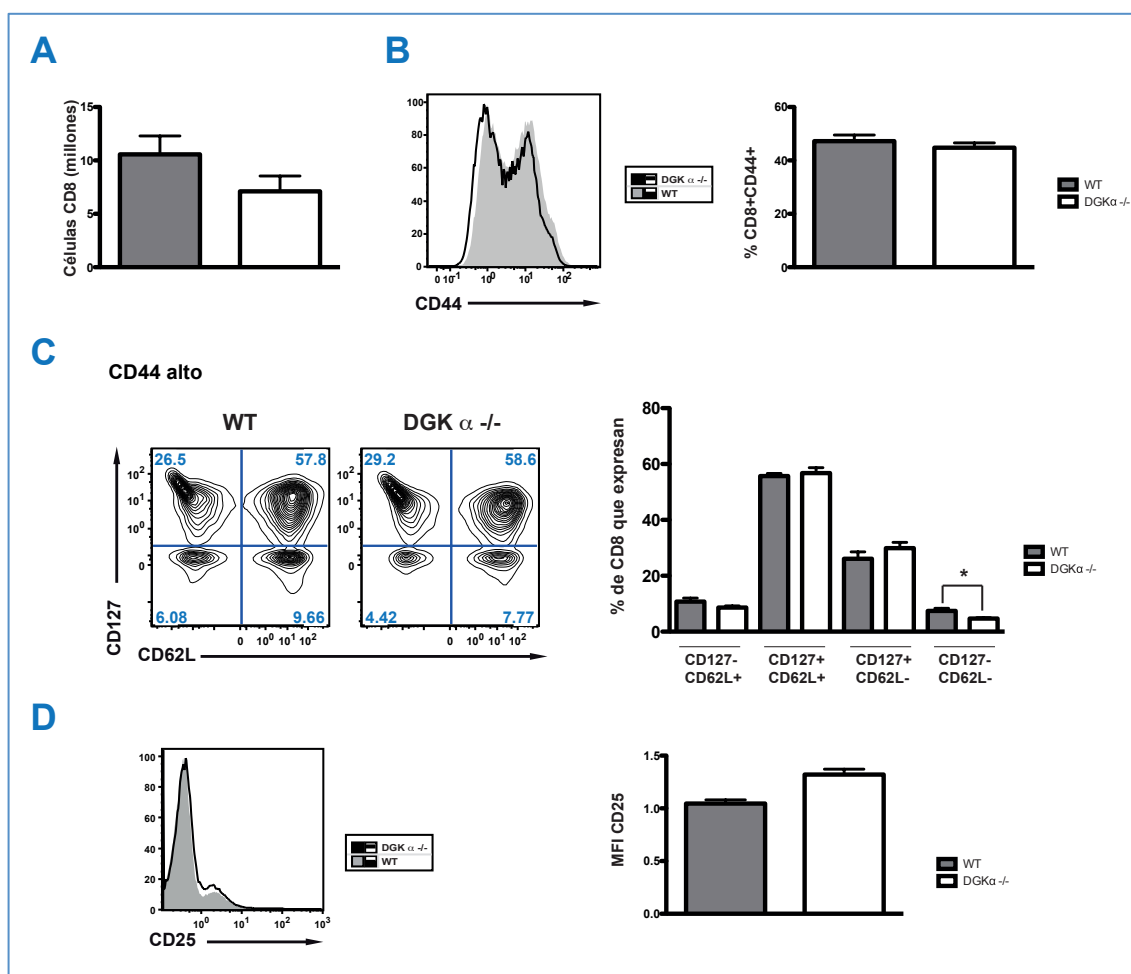


Figura 28. Caracterización de las poblaciones CD8 en el bazo de los ratones que portan el tumor subcutáneo EL4 a día 21. Análisis de las poblaciones T CD8 linfocitarias esplénicas procedentes de ratones WT y DGKα^{-/-} tras 21 días portando el tumor subcutáneo EL4. **(A)** Cuantificación de número de células CD8 en bazo. **(B)** Medida de la expresión de CD44 (izquierda) y cuantificación del porcentaje de células CD44⁺ (derecha). **(C)** Medida de la expresión de los marcadores CD62L, CD127 en las células CD8 con alto nivel de expresión de CD44 (CD44 alto) (izquierda) y su cuantificación (derecha). **(D)** Medida de la expresión de CD25 (izquierda), y cuantificación de su MFI (derecha). Se realizaron 2 experimentos independientes con n=5 por grupo. Se aplicó una prueba t de Student donde *p<0,05, **p<0,01 y ***p<0,001.

El bazo de los ratones DGKα^{-/-} portadores del tumor a día 21 también mostraba una reducción en el número de células CD4 (**Fig 29 A**), junto con una disminución de la expresión de CD44 en las células CD4 (**Fig 29 B**), mientras que las CD4 con alta expresión de CD44 no

exhibían cambios importantes en las subpoblaciones existentes, en función de la expresión de CD62L y CD127 entre los dos grupos, observándose un ligero incremento de las células CD127⁺ CD62L⁺ (Fig 29 C). Asimismo, las células CD4 del bazo de los ratones DGK α ^{-/-} expresaban menor nivel de CD25 y, a pesar de ser positivas para FOXP3, los niveles de expresión de este factor de transcripción eran menores comparados con los ratones WT (Fig 29 D), pudiendo sugerir una recirculación de células con menor expresión de FOXP3 al bazo.

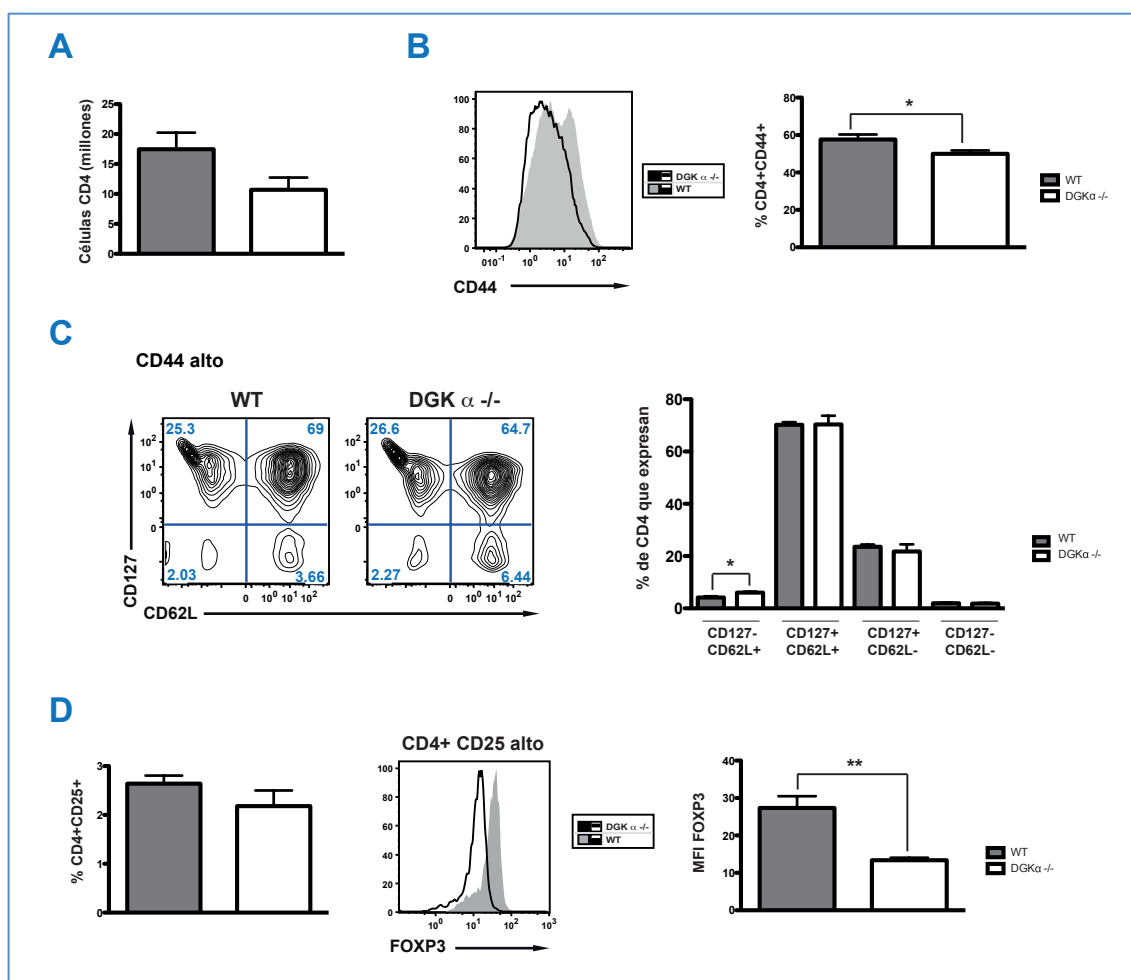


Figura 29. Caracterización de las poblaciones CD4 en el bazo de los ratones que portan el tumor subcutáneo EL4 a día 21. Análisis de las poblaciones T CD4 linfocitarias esplénicas procedentes de ratones WT y DGK α ^{-/-} tras 21 días portando el tumor subcutáneo EL4 (A) Cuantificación de número de células CD4 en bazo. (B) Medida de la expresión de CD44 (izquierda) y cuantificación del porcentaje de células CD44⁺. (C) Medida de la expresión de los marcadores CD62L, CD127 en las células CD4 con alto nivel de expresión de CD44 (izquierda) y su cuantificación (derecha). (D) Cuantificación del porcentaje de células CD4 que expresan CD25 (izquierda), medida de la expresión de FOXP3 dentro de las CD4 con alta expresión de CD25 (centro), y cuantificación del MFI de FOXP3 (derecha). Se realizaron 2 experimentos independientes con n=5 por grupo. Se aplicó una prueba t de Student donde *= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$ y ***= $p < 0,001$.

El análisis de los infiltrados tumorales revela una disminución drástica de poblaciones CD8 efectoras, así como una activación defectuosa de las poblaciones CD4 Th1 y defectos en la expresión de FOXP3 en los infiltrados tumorales de los ratones DGK α ^{-/-}. Tras estas observaciones decidimos evaluar más detalladamente la evolución de los tumores durante los

primeros 21 días tras la inoculación. El análisis del progreso del crecimiento tumoral (**Fig 22 A**) muestra una primera fase de crecimiento y respuesta inmune activa frente al tumor que transcurre de forma similar en los ratones WT y los $DGK\alpha^{-/-}$ aunque se aprecian ligeras diferencias en tamaño entre los dos grupos (hasta día 9). Tras este periodo, el crecimiento tumoral disminuye probablemente debido a la respuesta inmune inicial. Sin embargo, días después de la reducción en tamaño tumoral (aproximadamente día 15), aparecen diferencias importantes entre los dos tipos de ratones. Mientras que los tumores en los ratones WT vuelven a crecer ligeramente, en los ratones $DGK\alpha^{-/-}$ el aumento es mucho más marcado, sugiriendo una mayor evasión de la respuesta inmune.

Decidimos comparar el análisis realizado a día 21 con un análisis mas temprano (día 9) para evaluar si los defectos en los ratones $DGK\alpha^{-/-}$ tenían su origen en una respuesta primaria inmune alterada o más bien se debían a defectos más tardíos.

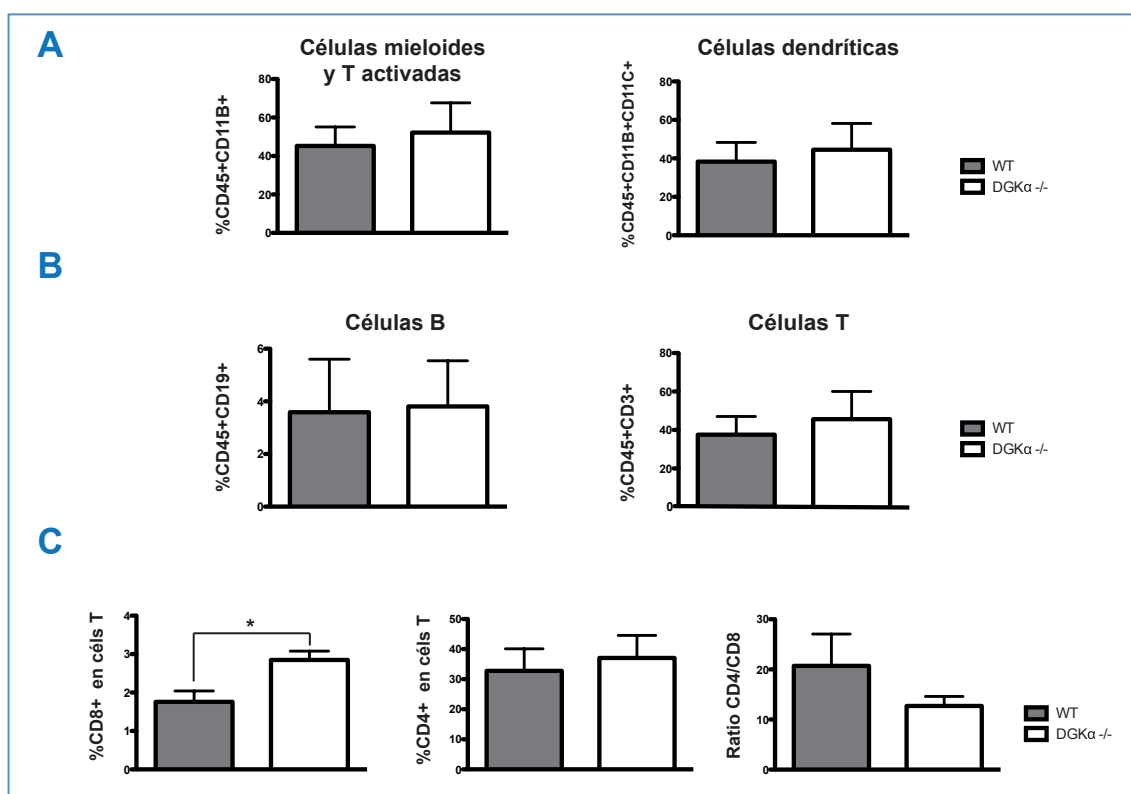


Figura 30. Caracterización del infiltrado leucocitario intratumoral a día 9 tras la inoculación del tumor subcutáneo EL4. Se determinó el infiltrado leucocitario tras disgregación de los tumores en ratones WT y deficientes para $DGK\alpha$ y posterior tinción con anticuerpos específicos para su análisis por citometría de flujo. **(A)** Cuantificación del porcentaje de células mieloides y T activadas ($CD45^+CD11B^+$), dendríticas ($CD45^+CD11B^+CD11c^+$), células B ($CD45^+CD19^+$). **(B)** Cuantificación del porcentaje de células y T ($CD45^+CD3^+$) y en la población T el porcentaje de células CD4 y CD8 y ratio CD4/CD8 **(C)**. Se realizaron 2 experimentos independientes con n=5 por grupo. Se aplicó una prueba t de Student donde *= $p<0,05$, **= $p<0,01$ y ***= $p<0,001$.

El análisis de los infiltrados tumorales a día 9 tras la inoculación mostró un mínimo incremento en la infiltración de células mieloides y dendríticas, células B y T (**Fig 30 A y B**). Sin embargo, al discriminar entre las poblaciones CD4 y CD8, se observó un marcado aumento

en la infiltración de las células CD8 en los ratones deficientes para DGK α , sin apenas cambios en las CD4, (**Fig 30 C**) de forma que la proporción entre CD4/CD8 era menor. Analizando más en detalle el fenotipo de las células T infiltradas en el tumor, se pudo observar que el porcentaje de células CD4 CD44⁺ era el mismo (100%) (**Fig 31 A**), aunque las células deficientes para DGK α mostraban una expresión más alta de CD44, reflejo de mayor respuesta frente al antígeno.

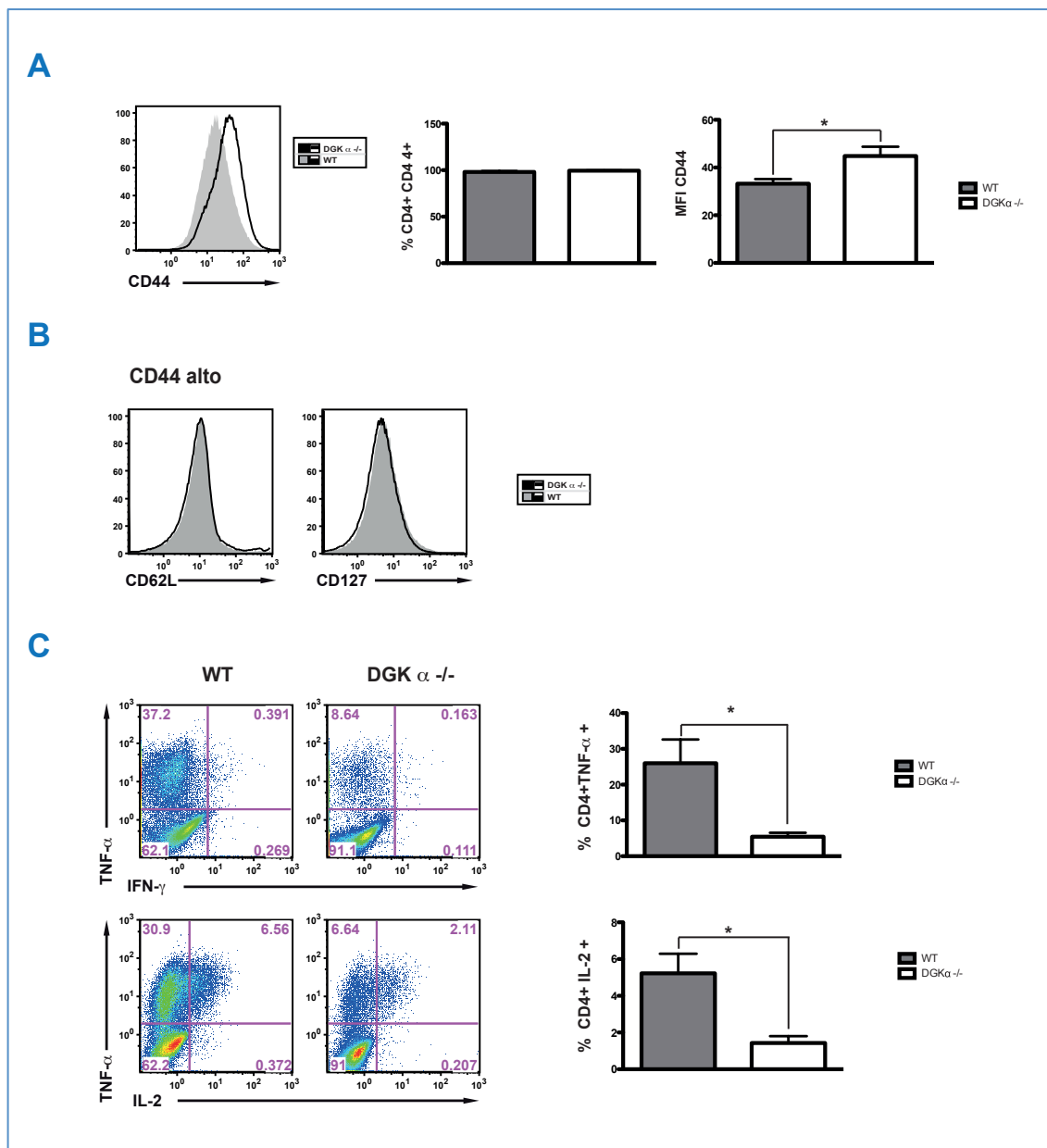


Figura 31. Análisis fenotípico de los linfocitos T CD4 infiltrados en el tumor subcutáneo EL4 a día 9 tras la inoculación. Se midió la expresión de marcadores de activación y citoquinas expresadas en los linfocitos T CD4 infiltrados del tumor subcutáneo EL4 a día 21 tras la inoculación en ratones WT y deficientes para DGK α (**A**) Medida de expresión de CD44 (izquierda), cuantificación del porcentaje de células CD44⁺ (centro) y su MFI (derecha). (**B**) Expresión de los marcadores CD62L y CD127 en las células CD4 con alto nivel de expresión de CD44 (CD44 alto). (**C**) Medida de expresión de TNF- α , IL-2 e IFN- γ (izquierda) y cuantificación de las que expresan TNF- α e IL-2 (derecha). Se realizaron 2 experimentos independientes con n=5 por grupo. Se aplicó una prueba t de Student donde *= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$ y ***= $p < 0,001$

Resultados

Las células CD4 con alta expresión de CD44 (**Fig 31 B**) presentaban un fenotipo CD62L⁻ y CD127⁻ correspondiente a una respuesta inmune activa, sin manifestar diferencias entre los dos grupos. El análisis de producción de citoquinas reveló que, a pesar de su fenotipo activado con niveles aumentados de CD44 y baja expresión de CD62L y CD127, las células CD4 deficientes en DGK α no presentaban una respuesta Th1 eficaz frente al tumor, presentando menor producción de TNF- α e IL-2 que las células CD4 WT (**Fig 31 C**). La producción de IFN- γ no se pudo detectar en ambos grupos.

Respecto a las células CD4 Treg infiltradas no se encontró incremento de células CD4⁺CD25⁺ (**Fig 32 A**), pero en la población CD4⁺CD25⁺ se observó la existencia de dos niveles de expresión de FOXP3 en los ratones DGK α ^{-/-}, a diferencia de lo observado en las células WT que presentaban una expresión uniforme de FOXP3 (**Fig 32 B**). Estos datos correlacionan con los observados a día 21, pero las diferencias en nivel de expresión de FOXP3 entre los dos grupos son menores que las observadas a día 21.

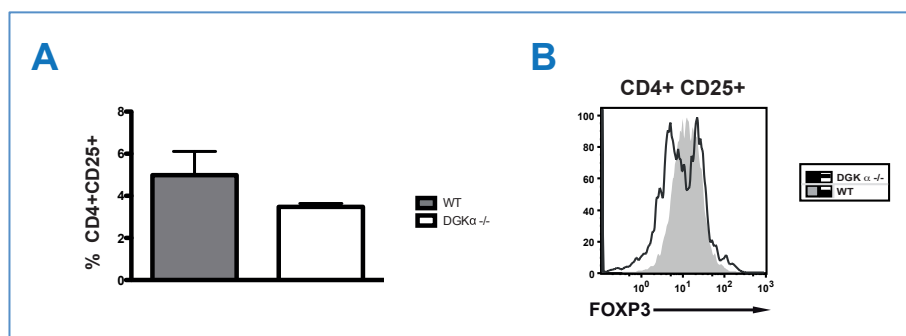


Figura 32. La deficiencia de DGK α lleva a una expresión alterada de FOXP3 en las células T CD4 infiltradas en el tumor subcutáneo EL4 a día 9 tras la inoculación. (A) Cuantificación del porcentaje de células CD4 que expresan CD25 en el infiltrado tumoral de los ratones WT y deficientes para DGK α . **(B)** Medida de la expresión de FOXP3 dentro de la población CD4⁺CD25⁺. Se realizaron 2 experimentos independientes con n=5 por grupo.

A diferencia de lo observado a día 21, las células CD8 infiltradas a día 9 presentaban un fenotipo similar en los ratones WT y los DGK α ^{-/-}. Las células CD8 expresaban altos niveles de CD44⁺ (**Fig 33 A**), reflejando que han respondido al antígeno, pero no se observó bajada en sus niveles de CD62L y de CD127, indicando que no poseen un fenotipo efector, esto puede ser debido a que la respuesta activa de las células CD8 no esté ocurriendo en ese periodo. En relación a las citoquinas producidas por las células CD8 a día 9 (**Fig 33 B**), tampoco se observaron diferencias significativas de expresión de TNF- α , IL-2 e IFN- γ entre los dos grupos.

Los datos obtenidos indican una respuesta citotóxica muy distinta en un modelo *in vivo* que la observada *in vitro* y sugieren alteraciones importantes en la diferenciación de las poblaciones Th1 y Treg. Además, la existencia de una expresión diferencial de células FOXP3⁺ en el tumor en ratones DGK α ^{-/-} podría estar afectando a la activación y diferenciación de la población CD8. Asimismo, en el microambiente tumoral no diferenciamos entre células Treg

inducidas en el tumor y Treg naturales, por lo que decidimos entonces examinar en detalle la contribución de la DGK α a la diferenciación de la población de células Treg naturales y iTreg.

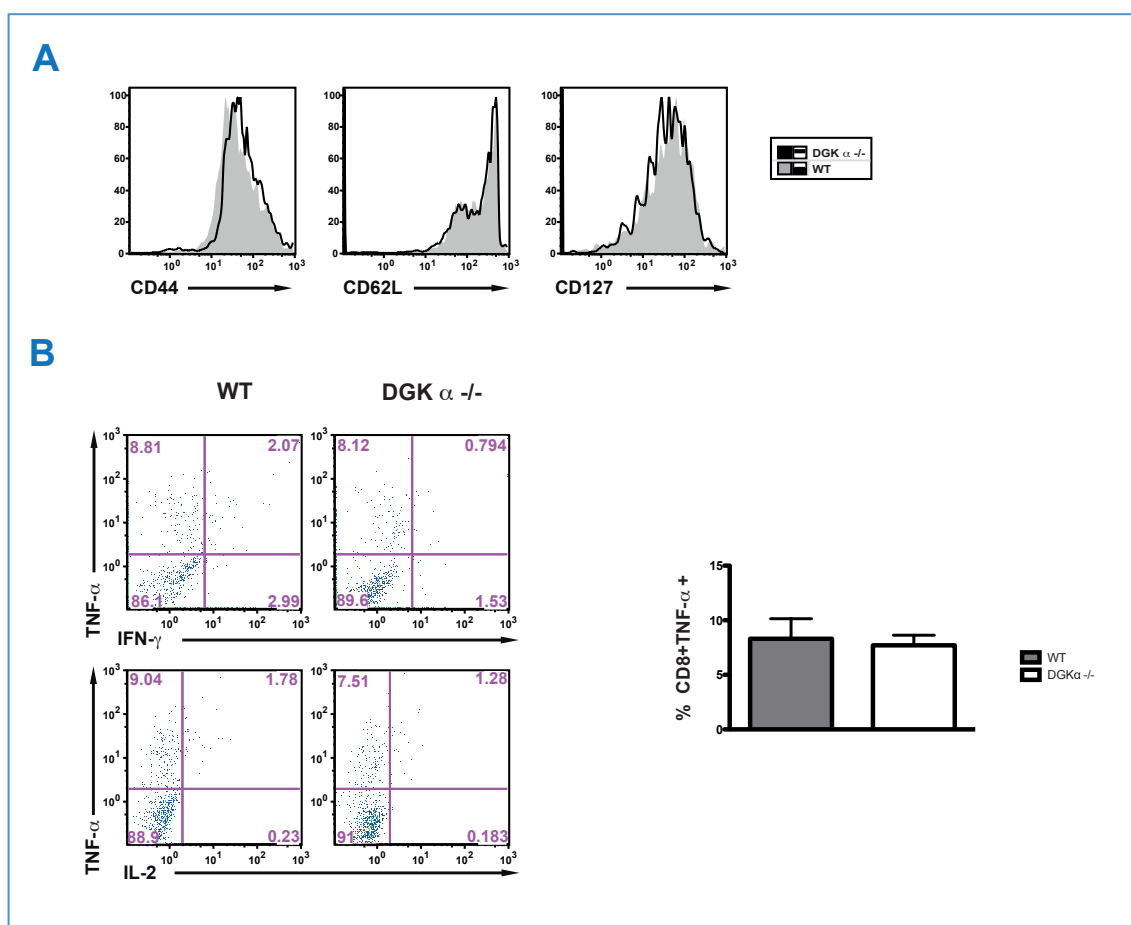


Figura 33. Análisis fenotípico de los linfocitos T CD8 infiltrados en el tumor subcutáneo EL4 a día 9 tras la inoculación. Se midió la expresión de marcadores de activación y citoquinas expresadas en los linfocitos T CD8 infiltrados del tumor subcutáneo EL4 a día 9 tras la inoculación en ratones WT y deficientes para DGK α . **(A)** Medida de expresión de CD44, CD62L y CD127. **(B)** Medida de expresión de TNF- α , IL-2 e IFN- γ (izquierda) y cuantificación de las que expresan TNF- α (derecha). Se realizaron 2 experimentos independientes de n=5 por grupo.

6. PAPEL DE LA DGK α EN LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS T REGULADORAS

6.1 Contribución de DGK α a la diferenciación de las células T reguladoras naturales

Se ha demostrado previamente que el gen de la DGK α tiene una expresión alta en las células Treg humanas y de ratón en comparación con las CD4 *naïve* (Pfoertner et al., 2006). Además, las células Treg poseen un fenotipo anérgico, y su activación (medida como expresión de CD69) y proliferación incrementa tras su tratamiento con el inhibidor R59 (Hickman et al., 2006), sugiriendo un papel importante de las DGKs en la funcionalidad y proliferación de las Treg. Estos datos, unidos a los obtenidos en tumores nos llevó a estudiar en detalle las

poblaciones Treg naturales e inducidas en los ratones deficientes para $DGK\alpha$. El análisis de las células $CD4^+CD25^+$ y Treg naturales ($CD4^+CD25^+FOXP3^+$) (Fig 34) tanto en timo como en bazo y ganglios, no reveló diferencias significativas en los ratones deficientes para $DGK\alpha$, sugiriendo que la deficiencia de la $DGK\alpha$ no afecta al desarrollo tímico de las células Treg ni a su posterior migración a periferia.

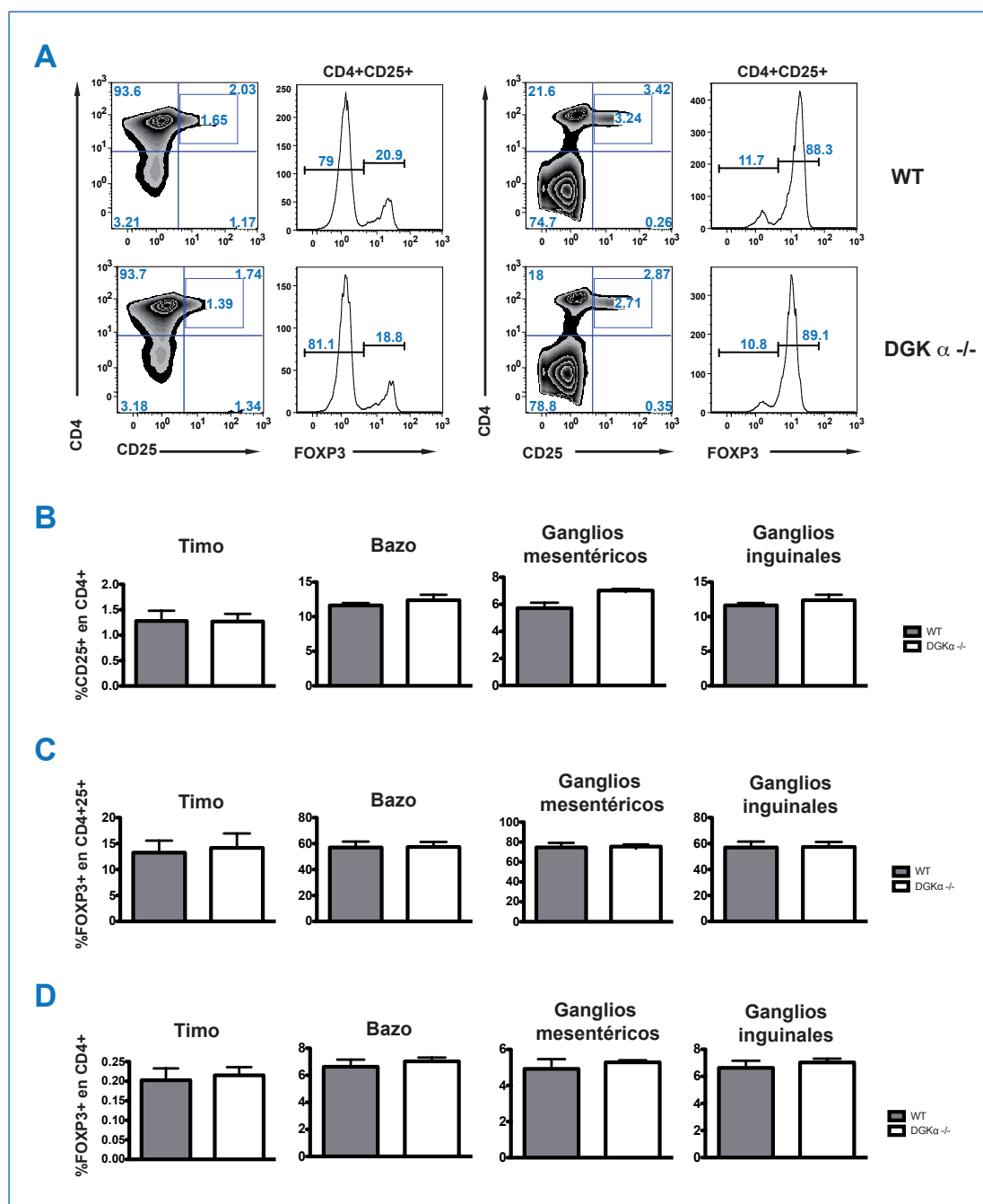


Figura 34. El desarrollo de las células Treg naturales no se ve afectado por la deficiencia de $DGK\alpha$. Análisis de las poblaciones de Treg naturales en ganglios, bazo y timo de ratones WT y deficientes para $DGK\alpha$. **(A)** Medida de la expresión de CD25 en CD4 y de FOXP3 en las células $CD4^+CD25^+$ de timo y bazo. **(B)** Cuantificación del porcentaje de células $CD4^+CD25^+$. **(C)** Cuantificación del porcentaje de células FOXP3⁺ en las $CD4^+CD25^+$. **(D)** Cuantificación del porcentaje de células $CD4^+FOXP3^+$. n=10 por grupo.

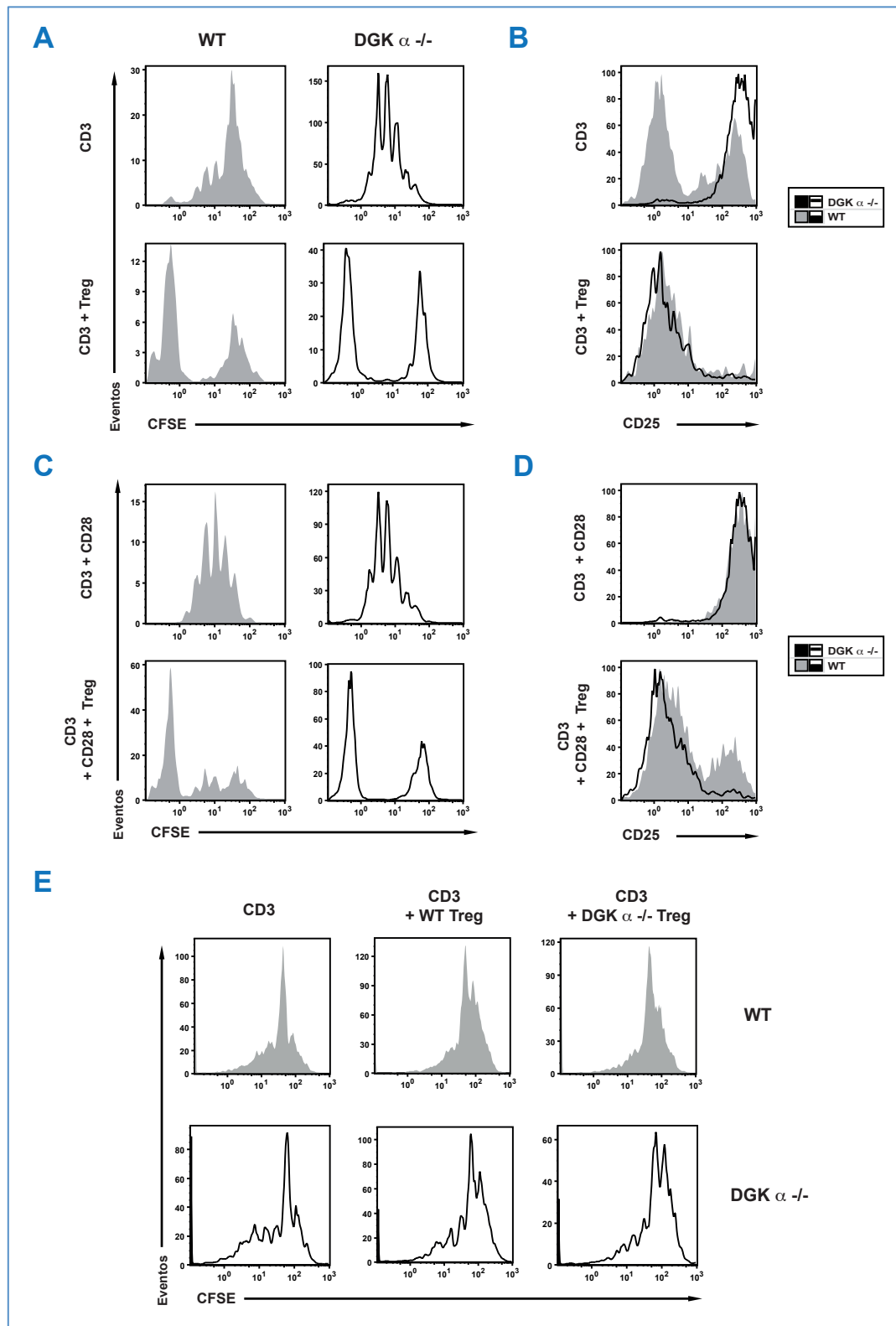


Figura 35. La deficiencia de DGK α afecta a la capacidad proliferativa de las células T CD4 efectoras pero no a la supresora de las células T CD4 reguladoras naturales. Análisis de la proliferación de células CD4 y supresión por Treg de ratones WT y deficientes para DGK α . Células T CD4⁺CD25⁻ aisladas de ratones WT y DGK $\alpha^{-/-}$ se marcaron con CFSE y se estimularon con anti-CD3 y APCs irradiadas en presencia o ausencia de anti-CD28, añadiendo Treg propias en un ratio 1:2 (Treg: CD4⁺CD25⁻) cuando se indica. **(A)** Medida de la proliferación y supresión por dilución de CFSE y expresión de CD25 **(B)**. **(C y D)** mismas medidas que en A y B pero en presencia de anti-CD28. **(E)** Supresión cruzada, en la que se utilizaron Treg de los dos grupos en proporción 1:1, midiendo la inhibición de proliferación por Treg tanto propia como frente al otro grupo. Se realizaron 2 experimentos independientes con n=3 por grupo.

A continuación evaluamos la capacidad supresora de las Treg de los ratones deficientes para $DGK\alpha$. Para ello, se aislaron células $CD4^+CD25^-$ *naïve* y células Treg naturales de bazo de ratones WT y deficientes para $DGK\alpha$. Las células $CD4$ *naïve* se estimularon con anti-CD3 soluble en presencia de APCs y se determinó su proliferación mediante medida de dilución de CFSE. El análisis confirmó la mayor proliferación de las células $CD4$ tras la estimulación del TCR y la mayor inducción de CD25 (**Fig 35 A y B, panel superior**). Asimismo se comprobó que la mayor ventaja proliferativa se observa en condiciones de estimulación por CD3, ya que al estimular con anti-CD28 las diferencias observadas son menores (**Fig 35 C y D, panel superior**). La adición de células Treg deficientes en $DGK\alpha$ en un ratio 1:2 (Treg: $CD4^+CD25^-$) inhibió la proliferación de las células efectoras, confirmando que la ausencia de $DGK\alpha$ no afecta a la funcionalidad de las células Treg naturales (**Fig 35 A, B, C, D panel inferior**). Este resultado explica el fenotipo de los ratones deficientes para $DGK\alpha$ que, a diferencia de otros modelos de deficiencia en reguladores negativos de la estimulación antigénica, no presentan signos obvios de autoinmunidad. Los experimentos de supresión cruzada en los que se añadieron Treg en un ratio 1:1 a las $CD4^+CD25^-$ confirmaron la capacidad de que las células efectoras deficientes para $DGK\alpha$ pueden ser inhibidas por las Treg naturales posean o no $DGK\alpha$ (**Fig 35 E**). Esta característica no aparece en otros modelos de ratón deficientes para genes relacionados con la anergia, en los que sus células Treg naturales no pueden suprimir a sus propias células efectoras, siendo el defecto atribuido a la resistencia de las células efectoras a ser suprimidas (Wohlfert et al., 2004).

La ausencia de $DGK\alpha$ no parece afectar la diferenciación de las poblaciones de células Treg naturales. Este hecho ayuda a comprender la falta de defectos autoinmunes en estos ratones, y además sugiere que la expresión de poblaciones con distintos niveles de FOXP3 en el entorno intratumoral pueda ser consecuencia de la diferenciación local de poblaciones reguladoras en respuesta a citoquinas producidas en este microambiente. Teniendo en cuenta que la secreción de altos niveles de TGF- β por las células EL4 es responsable de la inhibición de la respuesta inmune a tumores (Gorelik and Flavell, 2001; Won et al., 1999) y que esta citoquina es un potente inductor de poblaciones con actividad reguladora, decidimos estudiar la diferenciación de células iTreg por TGF- β .

6.2 Contribución de $DGK\alpha$ a la inducción de iTreg por TGF- β

Las células $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ inducidas en periferia (iTreg) se generan principalmente por mecanismos dependientes de TGF- β (Chen et al., 2003). Para analizar la implicación de la $DGK\alpha$ en la generación de las células iTreg por TGF- β , se aislaron células *naïve* $CD4^+CD25^-$ de bazo de ambos grupos, que fueron estimuladas con anti-CD3 pegado a

placa, anti-CD28 soluble e IL-2, en presencia o ausencia de TGF- β para inducir un fenotipo regulador o efector, respectivamente.

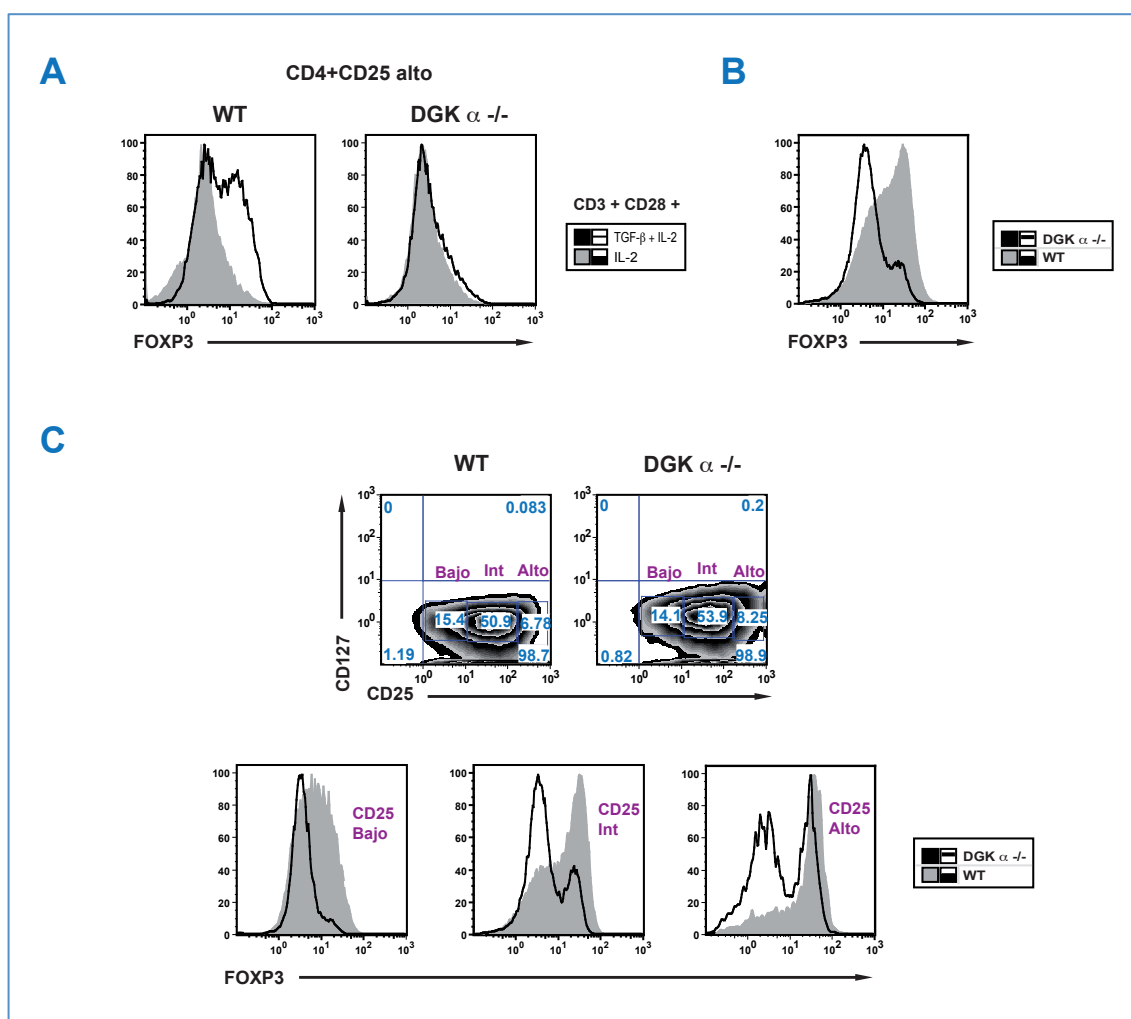


Figura 36. La inducción de células CD4+CD25+FOXP3+ *in vitro* se ve alterada por la deficiencia de DGK α . Células T CD4⁺CD25⁺ procedentes de ratones WT y deficientes para DGK α se estimularon en presencia de anti-CD3 pegado a placa, anti-CD28 e IL-2 en presencia o ausencia de TGF- β durante tres días. Las células cultivadas tres días en presencia de TGF- β fueron cultivadas por tres días más en presencia de IL-2 y TGF- β (A) Medida de la expresión de FOXP3 a día 3 en las células CD4 con alta expresión de CD25. (B) Medida a día 6 de la expresión de FOXP3 en las células CD4. (C) Medida de la expresión de CD25 y CD127 a día 6 en las CD4 (arriba). La expresión de FOXP3 (abajo) se midió en las poblaciones con distintos niveles de expresión de CD25 : bajo, intermedio (Int) y alto. Se realizaron 4 experimentos independientes con n=3 por grupo.

Sólo se observó la inducción de FOXP3 a los 3 días de tratamiento con TGF- β , siendo mucho menor en el caso de las células CD4 de ratones deficientes en DGK α (Fig 36 A). La estimulación continuada con IL-2 y TGF- β durante tres días más en las células WT favoreció la inducción de una población iTreg, con alta expresión de FOXP3, mientras que la misma estimulación se tradujo en una expresión de FOXP3 disminuida en ausencia de DGK α (Fig 36 B). El análisis de las poblaciones con distintos niveles de expresión de CD25 (bajo, intermedio o alto) mostró una reducción de la expresión de FOXP3 independiente de la expresión de CD25 (Fig 36 C).

Resultados

Los experimentos anteriores sugieren que la expresión de DGK α es necesaria para la inducción del factor de transcripción FOXP3, que define la población iTreg. Por tanto estudiamos la implicación de la expresión de la DGK α durante la inducción de células iTreg por TGF- β . Se purificaron células CD4 *naïve* de bazo de ratones WT que se diferenciaron a células efectoras o iTreg (anti-CD3 pegado a placa, anti-CD28, IL-2 +/- TGF- β) durante 72 horas.

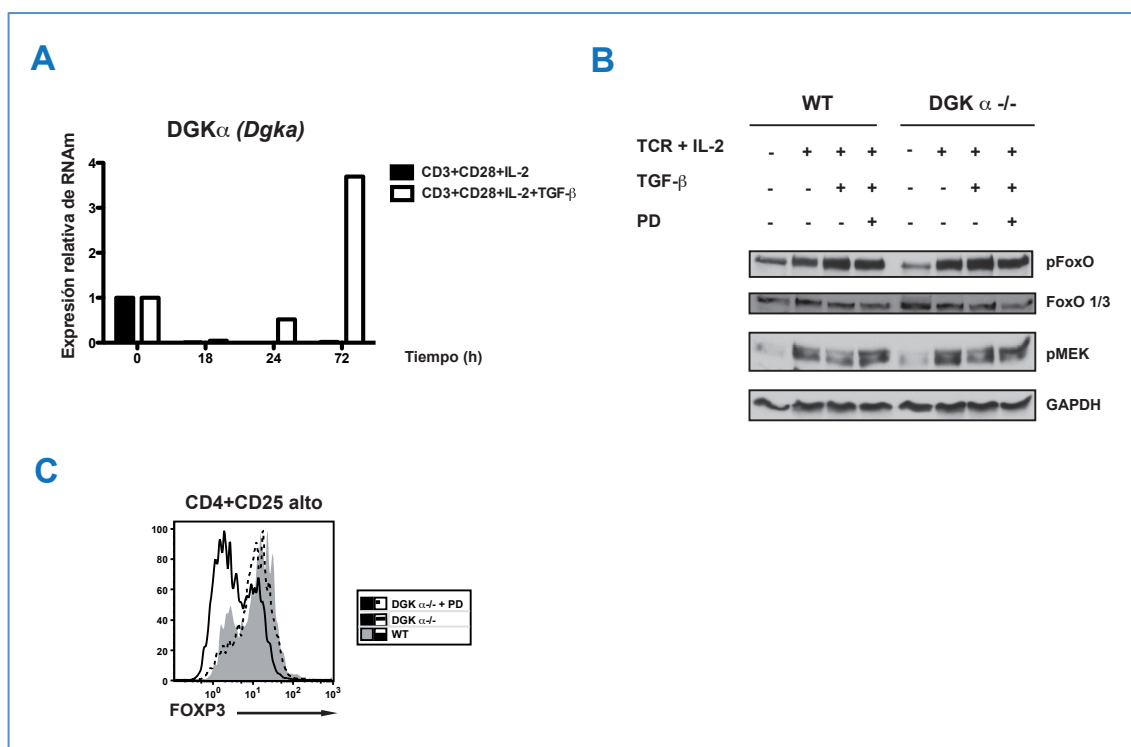


Figura 37. La DGK α está implicada en la inducción de iTreg por TGF- β y mediada por la activación de MAP quinasas. Células T CD4⁺CD25⁻ aisladas de ratones WT y deficientes para DGK α fueron estimuladas en presencia de anti-CD3 pegado a placa, anti-CD28 e IL-2 en presencia o ausencia de TGF- β durante tres días para generar iTreg. **(A)** Medida de la expresión de *Dgka* por PCR cuantitativa en el tiempo en células CD4 WT. **(B)** Los lisados totales de las células CD4 de ratones WT y deficientes para DGK α cultivadas en las condiciones anteriores en presencia o ausencia del inhibidor de MEK PD98059 se analizaron por WB tras 24 h para determinar el grado de fosforilación de MEK y FoxO. Como control de carga se determinaron los niveles de GAPDH. **(C)** Medida de la expresión de FOXP3 en las células CD4+CD25 alto tras tres días de inducción de iTreg en presencia o ausencia del inhibidor PD98059.

La expresión de *Dgka* se analizó por PCR cuantitativa a 18 h, 24 h y 72 h. Al igual que describimos para las células CD8, observamos una rápida disminución de la expresión de *Dgka* en condiciones de diferenciación a poblaciones efectoras. Por el contrario, el tratamiento de las células con TGF- β se tradujo en un aumento de la expresión de *Dgka* (Fig 37 A). Este aumento correlaciona con datos de múltiples laboratorios que han demostrado que la expresión de FOXP3 por esta citoquina requiere de señales débiles del TCR.

La inducción de FOXP3 se regula por un complejo programa transcripcional que incluye el factor de transcripción FoxO1 (Kerdiles et al., 2010). El análisis por WB tras 24 h de estimulación mostró mayor fosforilación de FoxO1 por la estimulación del TCR en las células CD4 procedentes de ratones DGK $\alpha^{-/-}$, mientras que la adición del TGF- β no dio lugar a cambios

diferenciales en su fosforilación entre ambos grupos (**Fig 37 B**). El análisis de la fosforilación de MEK que refleja la activación de Ras, el principal efector de la $DGK\alpha$, indicó que el tratamiento con TGF- β disminuía la activación de la ruta de Ras/ERK en ratones WT, efecto que se vio reducido ligeramente en los ratones deficientes en $DGK\alpha$. La importancia de inhibir la ruta de MAPK en la inducción de FOXP3 se puso de relevancia estimulando las células CD4 deficientes para $DGK\alpha$ en condiciones de inducción de iTreg en presencia del inhibidor competitivo de MEK1 y MEK2 PD98059. Este tratamiento indujo un aumento en la expresión de FOXP3 en estas células, alcanzando niveles similares a los observados en ratones WT (**Fig 37 C**).

La inducción de células iTreg requiere de un equilibrio entre las señales de la IL-2 y el TGF- β (Tischner et al., 2012). Nuestros datos previos indicaban una mayor sensibilidad a la IL-2 en los ratones deficientes para $DGK\alpha$, por lo que barajamos la posibilidad de que las diferencias observadas se debieran al uso de IL-2 exógena en los experimentos. Por este motivo decidimos examinar la inducción de poblaciones $CD25^+FOXP3^+$ en un modelo en el que no pudiera existir influencia diferencial de las citoquinas exógenas. Para ello, cruzamos los ratones deficientes para $DGK\alpha$ con el modelo OT-II. Estos ratones expresan el TCR transgénico OT-II ($V\alpha 2.1 V\beta 5.1$) que reconoce un péptido derivado de la Ovalbúmina (OVA, 323-339) en el contexto del MHC de clase II (Barnden et al., 1998), que nos permitió estudiar la diferenciación hacia células T efectoras y iTreg en condiciones de secreción de sus propias citoquinas.

7. PAPEL DE LA $DGK\alpha$ EN LA DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS T CD4

Una vez generada la población OT-II $DGK\alpha^{-/-}$ caracterizamos este modelo, sin encontrar grandes diferencias en el desarrollo tímico, que al igual que en el modelo OT-I, sólo presentaba una ligera disminución de la celularidad (**Fig 38 A**). La celularidad en bazo y ganglios era prácticamente normal en los ratones OT-II $DGK\alpha^{-/-}$, sin diferencias cuantitativas en las distintas poblaciones (**Fig 38 B y C**). El análisis de las poblaciones Treg naturales en timos de ratones jóvenes reveló un incremento de células $CD4^+CD25^+$ en los ratones OT-II $DGK\alpha^{-/-}$ que, sin embargo, presentaban menor porcentaje de células positivas para FOXP3 (**Fig 39 A**). En la periferia no se observaron diferencias significativas ni en bazo, ni en ganglios mesentéricos e inguinales (**Fig 39 B y C**).

Tras este análisis inicial procedimos a la diferenciación a poblaciones efectoras o reguladoras por estimulación de las células esplénicas con el péptido específico para el TCR transgénico OVA, en presencia o ausencia de TGF- β , midiendo la inducción de CD25 y de FOXP3 en células CD4 a día 3 y día 5. A día 3 se observó una mayor expresión de CD25 por

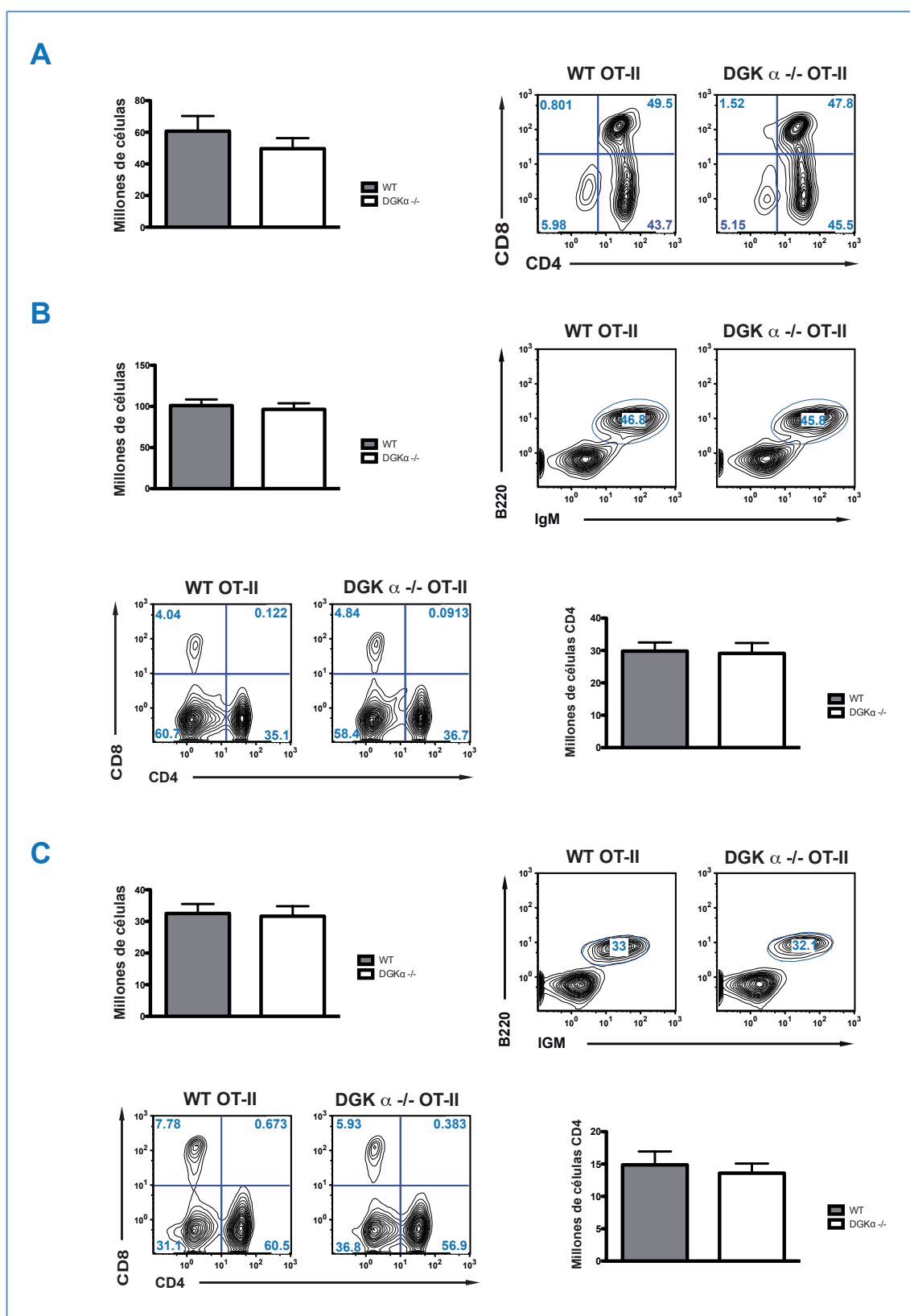


Figura 38. Análisis de las poblaciones tímicas y en periferia de los ratones OT-II deficientes en DGK α . Análisis de los timos, bazo y ganglios de ratones OT-II WT y deficientes para DGK α . **(A)** Celularidad del timo y porcentaje de células CD4 y CD8 dentro de las células positivas para el TCR transgénico. **(B)** Celularidad del bazo y porcentaje de células B tras tinción doble positiva para IgM y B220 (arriba). Porcentaje de CD4 y CD8 y recuento de células CD4 (abajo). **(C)** Celularidad de ganglios y porcentaje de células B tras tinción doble positiva para IgM y B220 (arriba). Porcentaje de CD4 y CD8 y recuento de células CD4 (abajo). n= 5 por grupo.

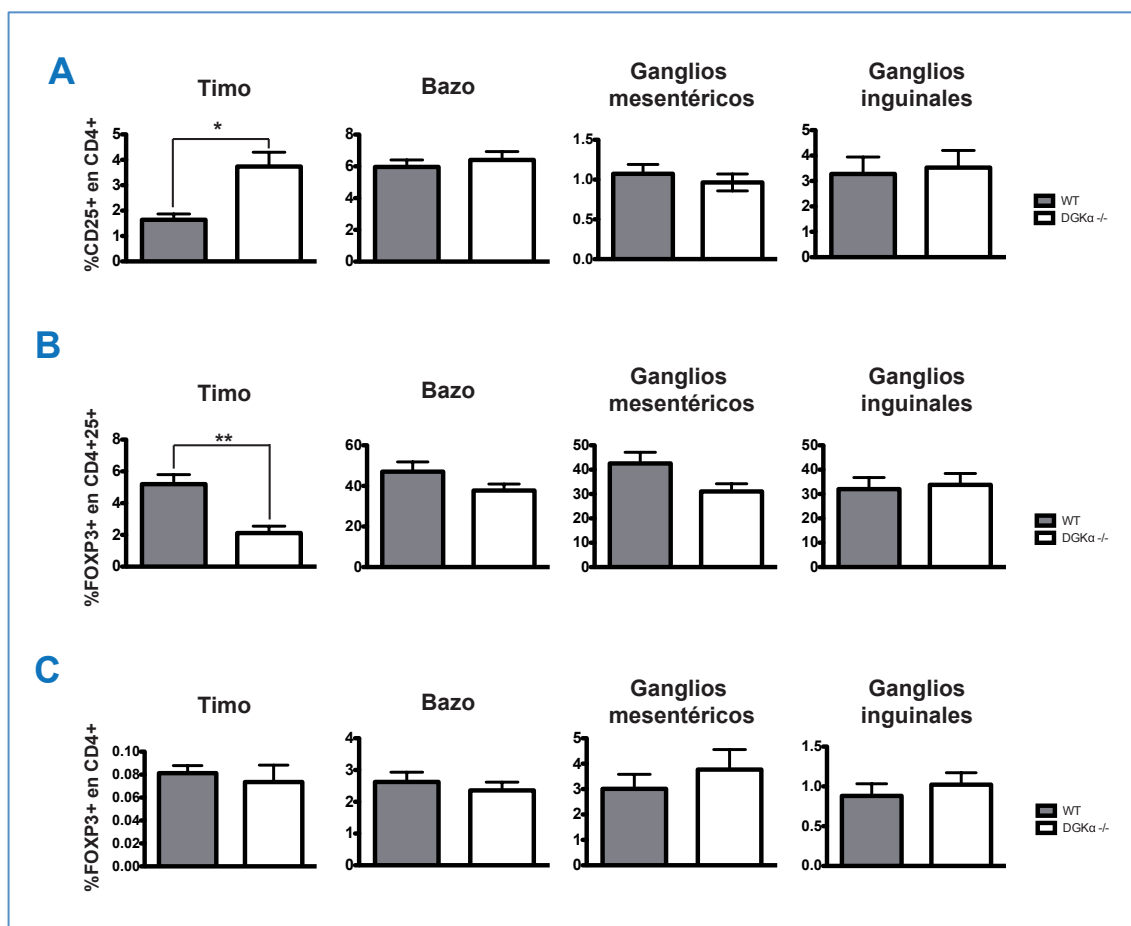


Figura 39. La deficiencia de DGKα no afecta a la migración a la periferia de las células T CD4 Treg naturales. Análisis de las poblaciones Treg naturales de ratones OT-II WT y deficientes para DGKα en timo, bazo, ganglios mesentéricos e inguinales. **(A)** Cuantificación de las células CD4⁺CD25⁺. **(B)** Cuantificación del porcentaje de células FOXP3⁺ en las CD4⁺CD25⁺. **(C)** Cuantificación del porcentaje de células CD4⁺FOXP3⁺. n=10 por grupo. Se aplicó una prueba t de Student donde *= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$ y ***= $p < 0,001$.

parte de los ratones OT-II DGKα^{-/-} tanto en presencia como en ausencia de TGF-β, mientras que la inducción de FOXP3 por TGF-β a día 3 fue mínima y similar en ambos grupos. A día 5 la mayoría de las células eran FOXP3⁺ en los ratones OT-II WT, mientras que el porcentaje de células positivas para FOXP3 estaba muy disminuido en las células CD4 de los ratones OT-II DGKα^{-/-} (Fig 40 A). Además, la expresión de CD25 observada para los ratones OT-II DGKα^{-/-} fue menor comparado con los OT-II WT.

Tras esta última observación se midieron los niveles de citoquinas secretadas en el sobrenadante del cultivo a día 5 para correlacionar lo observado en inducción de FOXP3 con el fenotipo secretor. El análisis de los sobrenadantes de las células OT-II DGKα^{-/-} estimuladas con OVA reveló una mayor secreción de IFN-γ y menor secreción de IL-2, confirmando su polarización hacia un fenotipo Th1, ya que una vez que la célula se ha diferenciado a un fenotipo Th1 la expresión de T-bet inhibe la producción de IL-2 (Hwang et al., 2005a) (Fig 40 B). El tratamiento con TGF-β inhibió la secreción de IL-2 en ambos grupos confirmando el efecto “anergizante” de esta citoquina (Wahl and Chen, 2003).

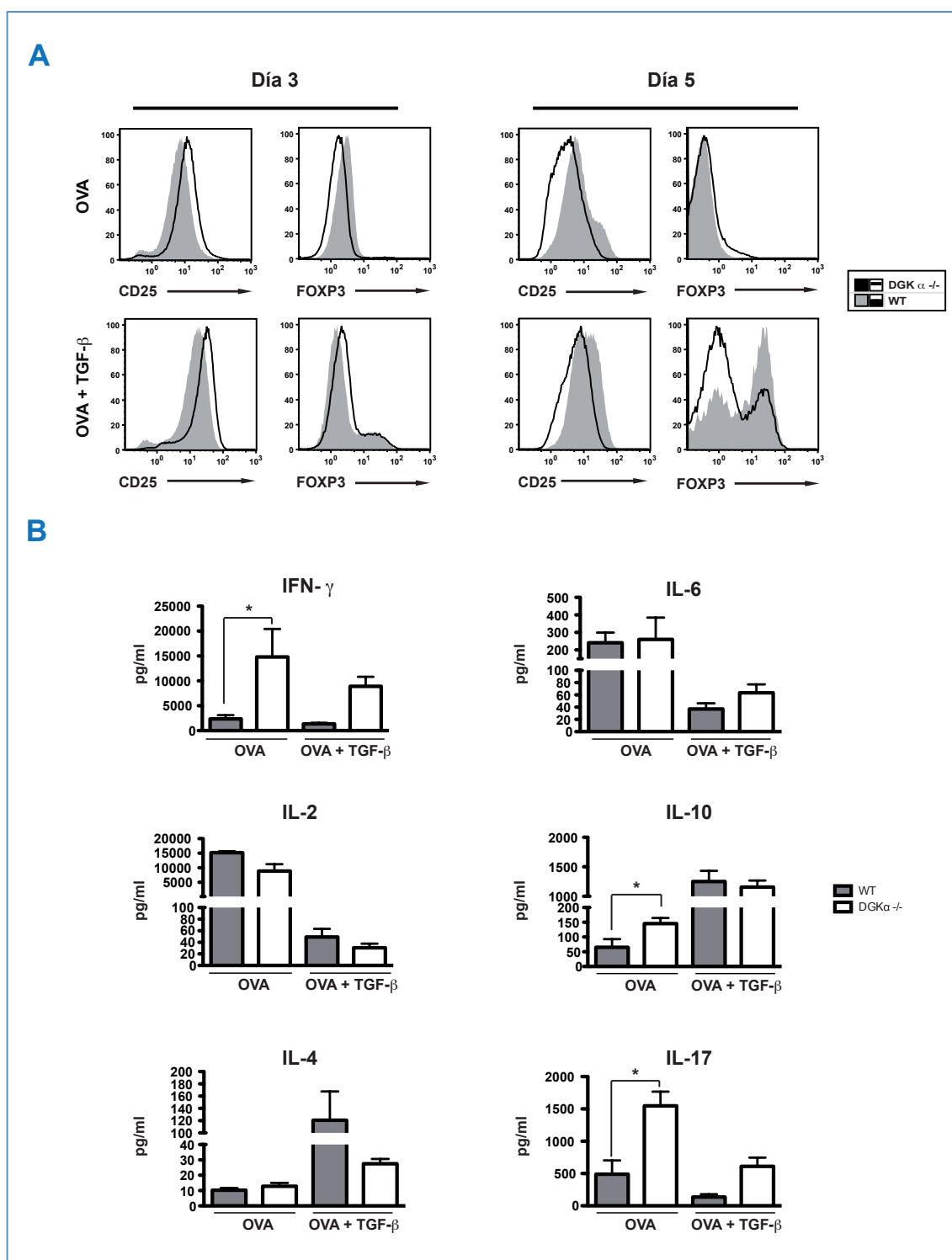


Figura 40. La inducción de iTreg FOXP3+ *in vitro* en ratones OT-II se ve afectada por la deficiencia de DGK α , unido a un patrón alterado de secreción de citoquinas. Esplenocitos totales de ratones OT-II WT y deficientes para DGK α fueron estimulados con el péptido específico para el TCR transgénico (OVA) en presencia o ausencia de TGF- β durante 5 días. **(A)** Medida de la expresión de CD25 y FOXP3 en células CD4 a día 3 y 5. **(B)** Medida de las citoquinas IL-2, IL-4, IL-6, IFN- γ , IL-10, IL-17 por Multiplex Luminex en los sobrenadantes de los cultivos a día 5. Se realizaron 3 experimentos independientes con n=4 por grupo. Se aplicó una prueba t de Student donde *= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$ y ***= $p < 0,001$.

Aunque el TGF- β también disminuyó la secreción de IFN- γ , los niveles de estas citoquinas seguían siendo muy altos en los ratones OT-II DGK $\alpha^{-/-}$. Se observó además un incremento significativo en la secreción de IL-10 e IL-17 por parte de los ratones OT-II DGK $\alpha^{-/-}$ tras la estimulación con OVA. El cultivo en presencia de TGF- β favoreció la secreción de IL-10, característica de las células con capacidad reguladora. No se observaron diferencias significativas en los niveles de IL-4 (Th2) e IL-6 (Th2 y Th17). Los resultados anteriores sugieren que las principales diferencias observadas entre grupos son debidas a una respuesta más fuerte al OVA en términos de secreción de IFN- γ (polarización a Th1), que se traduce en una menor sensibilidad al TGF- β . Debido a que la producción de IL-2 es independiente del ciclo celular, y regula la producción de IFN- γ tras la activación (Reem and Yeh, 1984), mientras que la síntesis de IFN- γ por el contrario está acoplada al ciclo celular (Bird et al., 1998; Bream et al., 2004), y tras obtener los anteriores resultados de secreción y los obtenidos en proliferación (**Fig 15**), decidimos examinar en detalle la influencia de la deficiencia de DGK α en la producción de citoquinas con relación a la capacidad proliferativa de las células. Decidimos estudiar en primer lugar el efecto de diferentes dosis de estímulo frente a la deficiencia de la DGK α en células CD4, ya que el fenotipo de activación de las células CD4 deficientes para DGK α no es tan fácilmente observable como en las CD8. Para ello utilizamos células de ganglios de ratones OT-II y OT-II DGK $\alpha^{-/-}$, que se estimularon con dos dosis del péptido específico para el TCR transgénico, y se midieron diferentes parámetros de activación CD98, CD69 y CD25 en las células CD4 a tiempos tempranos tras la activación. Se observaron cambios significativos en la expresión de estos parámetros sólo a partir de las 20 h y a dosis bajas, confirmando los datos obtenidos sobre la influencia menor de la DGK α en la regulación negativa de la estimulación del TCR en las células CD4, comparado con las células CD8 (**Fig 41 A**). A tiempos más largos se midió la expresión de los parámetros metabólicos implicados en proliferación CD98 y CD71, así como la expresión de CD25 (**Fig 41 B**). Los resultados indicaron que a pesar de no existir grandes diferencias en las horas inmediatas tras la estimulación, DGK α limita la señal de estimulación de las células CD4 por lo que, a tiempos largos y dosis bajas de estimulación las células CD4 OT-II DGK $\alpha^{-/-}$ interpretan la señal como si fuera de alta dosis.

La señal de activación por el TCR coordina la entrada en ciclo celular con la producción de citoquinas, por lo que, una vez elegida la dosis de estimulación, esplenocitos de ratones OT-II WT y deficientes para DGK α se marcaron con CFSE y se estimularon con OVA, en presencia o ausencia de TGF- β . En paralelo a la dilución de CFSE, se monitorizó en las células CD4 la producción de IFN- γ , IL-2 e IL-17. La medida de la dilución de CFSE en las células estimuladas con OVA confirmó la existencia de un mayor porcentaje de células que dividen por ciclo en el caso de los ratones OT-II DGK $\alpha^{-/-}$, con un mayor porcentaje de células positivas para IFN- γ , IL-2 e IL-17 (**Fig 42 A izq**).

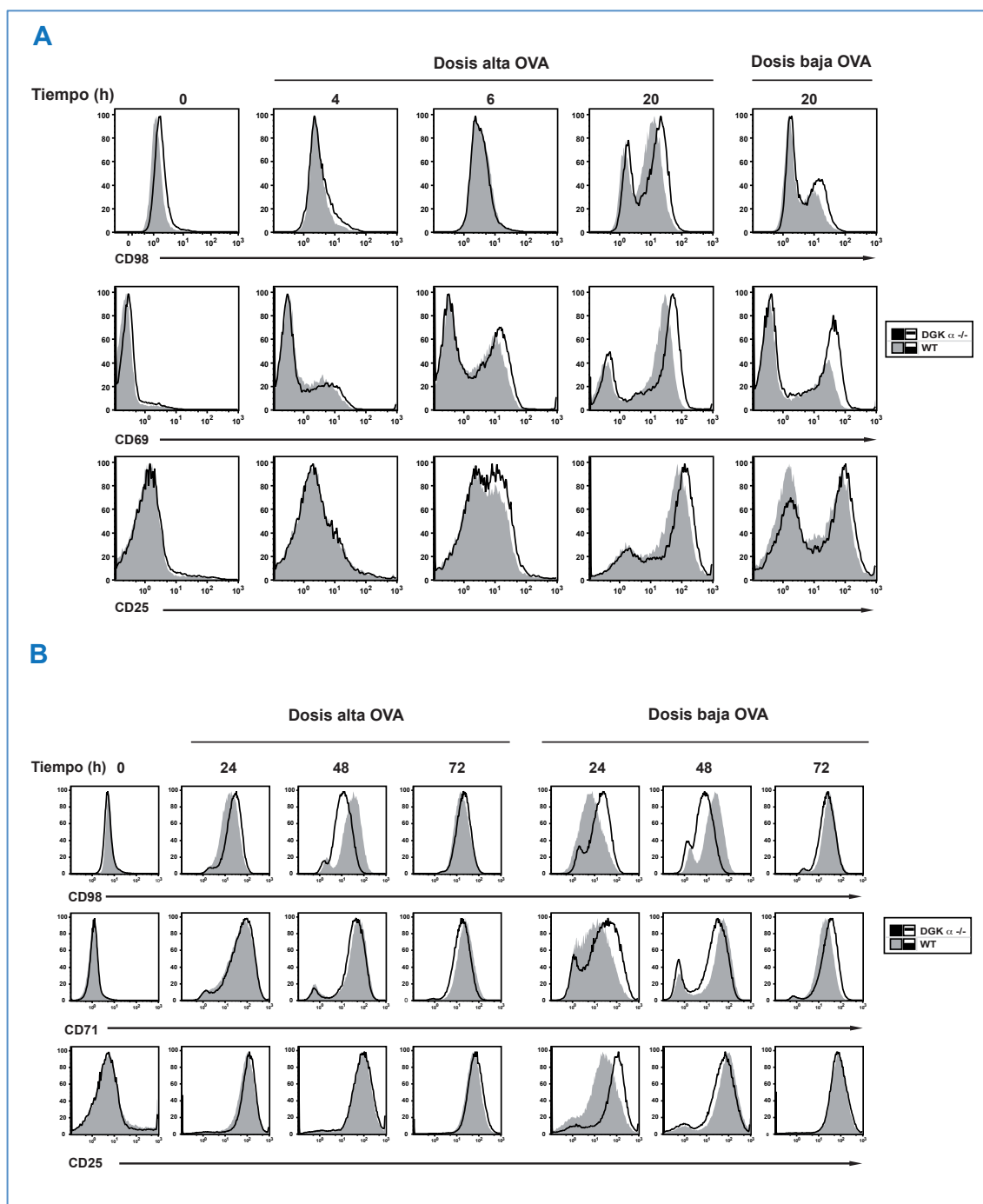


Figura 41. Las células CD4 deficientes en DGK α responden más fuertemente frente a una señal de activación débil. Células de ganglios de ratones OT-II WT y deficientes para DGK α fueron estimuladas con dos dosis diferentes del péptido OVA durante los tiempos indicados. **(A)** Medida de la expresión de CD98, CD69 y CD25 en células CD4 en estado basal y tras la estimulación con una dosis alta o dosis baja de OVA. **(B)** Expresión de los marcadores de activación CD98, CD25 y CD71 en células CD4 en estado basal y tras la estimulación con las dos dosis de OVA a tiempos largos. Se realizaron 2 experimentos independientes con n=4 por grupo

El tratamiento con TGF- β dio lugar a un descenso de la expresión de IL-2, IFN- γ y aumento de IL-17 en ambos grupos, conservándose la ventaja en la producción de IFN- γ e IL-17 por parte de los ratones OT-II DGK $\alpha^{-/-}$, sin embargo obteniendo un ligero descenso en la producción de IL-2 comparado con los OT-II WT (**Fig 42 A dcha**). Un análisis en mayor detalle representando el porcentaje de células positivas para cada citoquina en cada una de las

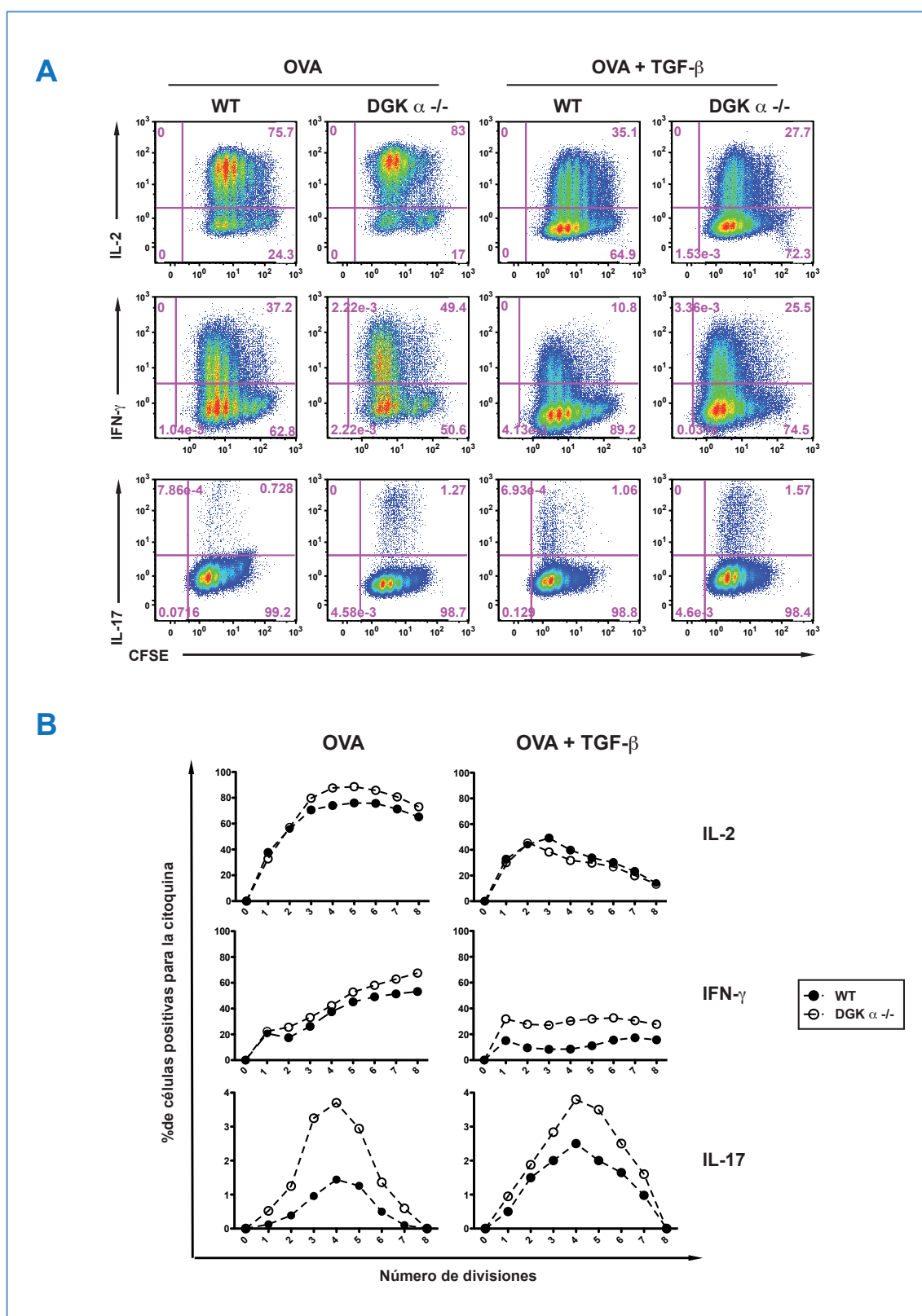


Figura 42. La deficiencia de DGK α afecta a la expresión de citoquinas de las células T CD4 tras la estimulación con OVA en presencia o ausencia de TGF- β . Esplenocitos totales de ratones OT-II WT y deficientes para DGK α fueron marcados con CFSE y estimulados durante 48 horas con el péptido OVA en presencia o ausencia de TGF- β . **(A)** Medida de la expresión de las citoquinas IL-2, IFN- γ e IL-17 junto con la proliferación por dilución de CFSE. **(B)** Cuantificación del porcentaje de células positivas para cada citoquina en cada uno de los picos de proliferación del CFSE de un individuo representativo por grupo. Se realizaron 3 experimentos independientes con n=3 por grupo.

divisiones confirmó un mayor porcentaje de células positivas para IFN- γ , IL-2 e IL-17 en cada división tras la estimulación con OVA en ratones OT-II DGK $\alpha^{-/-}$.

Estos experimentos sugieren que el aumento en la producción de citoquinas observado en los ratones OT-II DGK $\alpha^{-/-}$ se debe a la existencia de un incremento en el número de células por cada división, no a un mayor número de divisiones. La presencia de TGF- β disminuía de forma drástica la producción de IL-2 en los ratones WT, sin afectar a la proliferación (Fig 42 B). Se observó el mismo efecto en las células deficientes en DGK α , lo que sugiere que esta enzima no participa diferencialmente en el efecto del TGF- β sobre la producción de esta citoquina. Aunque no afecte al ciclo celular, la adición de TGF- β desacopló la producción de IFN- γ , que sólo aumentó en la primera división, para después no sufrir grandes cambios en las siguientes divisiones. El efecto del TGF- β fue el mismo en las células deficientes en DGK α que, no obstante, mantuvieron un nivel más elevado a lo largo de las sucesivas divisiones, siendo la ventaja frente al WT mayor que la observada en el tratamiento con OVA. Esta ventaja en producción de IFN- γ podría ser la causante de que exista incluso un mayor descenso en la producción de IL-2 en las células OT-II DGK $\alpha^{-/-}$ en presencia de TGF- β .

El TGF- β regula de forma positiva la secreción de la IL-17 (Martinez et al., 2010), observándose un incremento en su producción en ambos grupos, y una ventaja por la deficiencia de DGK α . Sin embargo, la producción de esta citoquina también terminó disminuyendo en los ratones deficientes para DGK α , posiblemente como consecuencia de la mayor producción de IFN- γ . Estos resultados confirman el análisis observado en sobrenadantes a tiempo final de diferenciación y sugieren que el defecto en la inducción de iTreg por TGF- β en las células deficientes en DGK α se debe en gran medida a una respuesta más potente a la activación antigénica.

DISCUSSION

La actividad DGK se describió por primera en 1959 (Hokin and Hokin, 1959), pero no fue hasta tres décadas después cuando se caracterizó la DGK α , la primera isoforma que fue clonada (Sakane et al., 1990). El análisis de su expresión en diferentes tejidos reveló un perfil muy específico, con alta expresión en timo y linfocitos T (Goto and Kondo, 1996). Estudios posteriores tanto en líneas celulares como en los ratones deficientes para esta enzima demostraron la participación de la DGK α en la activación linfocitaria. DGK α es una enzima citosólica que transloca a la membrana en respuesta a la activación del receptor de antígeno, actuando como regulador negativo de la ruta de Ras (Jones, 2002; Sanjuan et al., 2001; Sanjuan et al., 2003). Las células T de los ratones deficientes para DGK α presentan niveles elevados de RasGTP, mayor activación de ERK y proliferan más tras la estimulación del TCR, confirmando la función reguladora negativa de esta proteína en la activación linfocitaria (Olenchok et al., 2006).

En el presente trabajo se ha profundizado en el estudio de los mecanismos por los que la DGK α contribuye a regular la intensidad de la señal activadora del TCR, proceso que determina tanto la expansión inicial de las células T, como la posterior diferenciación hacia poblaciones efectoras, reguladoras y de memoria. También se ha estudiado en detalle el papel de DGK α en el control de los mecanismos de tolerancia *in vivo*, utilizando un modelo de respuesta a tumores.

1. PAPEL DE LA DGK α EN LA REGULACIÓN DE LA INTENSIDAD DE LA SEÑAL DEL TCR Y DE LA IL-2

El primer objetivo planteado en este estudio consistía en analizar en detalle el papel de la señal coestimuladora en la activación linfocitaria y la implicación de la DGK α en este sistema. El análisis de la señalización en linfocitos T reveló la existencia de ventajas en la fosforilación de ERK tras la estimulación sólo con anti-CD3 en los ratones deficientes para DGK α . Asimismo, la observación de un mayor porcentaje de células CD8 deficientes para DGK α que expresan CD69 tras estimulación con anti-CD3 confirmó la mayor activación de las rutas de Ras/ERK/AP-1 en estos ratones. El tratamiento con un inhibidor de DGKs no indujo mayor efecto, sugiriendo que inhibir la actividad de DGK α constituye uno de los principales requisitos de la señal coestimuladora en células CD8.

La estimulación del TCR resulta en la activación de la PI3K a través de su subunidad catalítica p110 δ , llevando a una señal de fosforilación débil y transitoria de los factores de transcripción FoxO (Okkenhaug et al., 2006). Experimentos recientes en nuestro laboratorio han dado lugar a la identificación de *Dgka* como un gen regulado por FoxO (Martinez-Moreno et al., 2012). La coestimulación da lugar a la activación de isoformas adicionales de PI3K, aumentando la fosforilación de FoxO. (Garcon et al., 2008). Esta fosforilación provoca su salida

del núcleo, y con ello, la bajada de transcripción de *Dgka*. Este mecanismo de regulación justifica que, en ausencia de coestimulación, los altos niveles de DGK α presentes en las células *naïve* no permitan una activación eficiente de la ruta de RasGRP1/Ras/ERK/AP-1.

Aunque en menor medida que la inducción de CD69, la deficiencia de DGK α en células T CD8 también se tradujo en un mayor porcentaje de células que expresan CD25 en ausencia de coestimulación, sugiriendo una posible ventaja en la respuesta a la IL-2 y con ello, mejor respuesta proliferativa. Sin embargo, los datos observados al utilizar el inhibidor farmacológico sugieren que la inducción de CD25 por la coestimulación requiere de la inhibición de otras DGKs. Estos resultados están de acuerdo con la participación de otros mecanismos como la ruta de PKC θ /NF- κ B (Coudronniere et al., 2000; Khoshnan et al., 2000; Takeda et al., 2008) en la inducción de CD25, así como con el papel de la DGK ζ como regulador negativo de las PKCs (Gharbi et al., 2013) (Ávila-Flores et al, datos no publicados).

La mayor inducción de los marcadores de activación en linfocitos CD8 deficientes en DGK α en ausencia de coestimulación concuerda con una mayor expresión de los marcadores metabólicos CD98 y CD71. Las células CD8 son muy dependientes de la señales inducidas por el TCR para su proliferación, y se ha descrito que la señal coestimuladora sirve para reducir el umbral de activación en estas células (Pardigon et al., 1998). La alta expresión de DGK α en células sin estimular limitaría dicho umbral, de manera que sólo señales fuertes de activación de la PI3K, que den lugar a disminución de la expresión de DGK α , serían capaces de inducir la entrada en el ciclo celular. La ausencia de DGK α en las células CD8 se traduce entonces en un mayor número de células capaces de responder, como indican los experimentos de proliferación, con mayor porcentaje de células que proliferan por división, pero con el mismo número de divisiones.

En los linfocitos T CD4 nuestro análisis sugiere una menor sensibilidad a la deficiencia de DGK α con respecto a la señal coestimuladora. Estos resultados concuerdan con los diferentes requerimientos de la señal coestimuladora en linfocitos CD8 y CD4. Un ejemplo importante es la activación de PKC θ mediante la interacción directa de CD28 con esta proteína (Isakov and Altman, 2012). Sin embargo, los ratones deficientes para PKC θ sólo presentan defectos en la activación de las poblaciones CD4, mientras que la activación de las células CD8 es normal (Healy et al., 2006), sugiriendo que la activación de PKC θ no es requerida para la señal coestimuladora en estas células.

A pesar de no observar grandes diferencias en parámetros de activación como la expresión de CD69, CD98 o CD71 entre las células CD4 de los dos grupos, se observa un incremento en el MFI de CD25 a 72h por la deficiencia de DGK α , en ausencia de señal coestimuladora. Este dato, junto con la ventaja proliferativa de las células CD4 en ausencia de IL-2 exógena, sugiere que la limitación impuesta por DGK α en la activación de la ruta de Ras/ERK afecta tanto a las células CD8 como las CD4 en la entrada en ciclo celular. Esta

función limitante de la proliferación concuerda con la caracterización de *Dgka* como uno de los genes relacionados con la inducción de la anergia en células CD4 (Macian et al., 2002). Las células CD4 de los ratones deficientes para esta proteína demuestran resistencia a la inducción de anergia (Olenchok et al., 2006), mientras que tras la sobreexpresión de DGK α se observa un fenotipo anérgico (Zha et al., 2006). Estudios más recientes han demostrado la regulación de DGK α por Egr2, uno de los factores de transcripción característicos de la anergia (Zheng et al., 2012). Además, recientemente se ha descrito que la coestimulación contribuye a localizar RasGRP1 en la sinapsis inmunológica en células CD4. De acuerdo con esta hipótesis, la transfección de un mutante constitutivamente activo de Ras mimetiza la señal del CD28, lo que se traduce en mayor fosforilación de AKT y ERK y mayor secreción de IL-2. Los autores sugieren que una de las señales por las que la coestimulación puede evitar la anergia sea reforzar la activación de la ruta de RasGRP1/Ras (Janardhan et al., 2011), lo que coincidiría con un posible papel de DGK α en este proceso.

Las células T una vez activadas, proliferan en respuesta a la IL-2 secretada. La deficiencia en DGK α sensibiliza las células a esta citoquina, como demuestran los experimentos de estimulación del TCR en presencia o ausencia de IL-2, donde la ganancia proliferativa observada por la deficiencia de DGK α se pierde al añadir IL-2 exógena. Además, tras una segunda estimulación con IL-2, se observa mejor respuesta proliferativa tanto en células CD8 como en células CD4 por la deficiencia de DGK α , relacionando DGK α con la expansión de las células T en respuesta a la IL-2.

2. PAPEL DE LA DGK α EN LA ACTIVACIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS CD8

Para profundizar en el papel de la DGK α en la regulación de la intensidad de la señal del TCR, y su posterior influencia en la diferenciación de las células CD8 a CTLs, utilizamos el modelo OT-I. Los ratones OT-I DGK $\alpha^{-/-}$ presentan un desarrollo tímico normal, de acuerdo con los fenotipos observados en los ratones deficientes para DGK α y DGK ζ (Olenchok et al., 2006; Zhong et al., 2003). Los ratones OT-I DGK $\alpha^{-/-}$ muestran menor celularidad en los ganglios y menor número de células CD8, junto con un incremento de expresión de CD44, fenotipo que se asemeja al descrito en los ratones OT-I deficientes para DGK ζ (Riese et al., 2011). En los ratones OT-I DGK $\alpha^{-/-}$ se observa, además, una ligera disminución en la expresión de CD62L en las células CD44⁺ en ganglios, lo que podría reflejar una cierta activación homeostática como resultado de activación basal de la ruta de Ras.

La regulación transcripcional de *Dgka* mediada por FoxO ayuda a comprender los resultados obtenidos en el modelo OT-I empleando péptidos con diferente afinidad por el TCR.

La estimulación con el péptido de alta afinidad (OVA) induce una mayor expresión de los marcadores de activación, pero esta ventaja es más patente cuando se emplea un péptido de menor afinidad. Estos resultados están de acuerdo con el hecho de que el aumento en la intensidad de la estimulación correlaciona con la mayor disminución de la expresión de *Dgka*.

La IL-2, además de activar la ruta de JAK/STAT (Moriggl et al., 1999; Nakajima et al., 1997) y con ello regular la expresión de CD25, es, al igual que la señal coestimuladora, un importante activador de la ruta de PI3K/AKT (Malek, 2008). FoxO1 controla la expresión de L-Selectina, CCR7 y S1P1, así como del receptor de IL-7, (Gubbels Bupp et al., 2009; Kerdiles et al., 2009; Ouyang and Li, 2011). La fosforilación de este factor de transcripción por la activación de la ruta de la PI3K/AKT se traduce en la inhibición de la expresión de estas moléculas tras la coestimulación del TCR, o la adición de la IL-2 (Waugh et al., 2009). La fosforilación de FoxO1 en respuesta a la IL-2 es clave en la regulación de la expresión de genes relacionados con el programa citotóxico, como son la perforina y el IFN- γ (Macintyre et al., 2011). El análisis de la expresión de *Dgka* en CTLs obtenidos de ratones OT-I tras la estimulación con OVA y diferenciación con IL-2 demuestra que la activación de la ruta PI3K/AKT por IL-2 es importante para mantener bajos niveles de *Dgka*. Al diferenciar las células CD8 deficientes para DGK α a CTLs con OVA, éstas son metabólicamente más activas y responden mejor a la IL-2 aunque no produzcan más IL-2, y tengan una mínima ventaja en producción de IFN- γ . Incluso con menos IL-2, las células deficientes en DGK α expresan mayores niveles de su receptor de alta afinidad. El análisis de células CD8 deficientes para DGK α demuestra una mayor respuesta no sólo a la estimulación antigénica, sino también a la IL-2 en términos de menor expresión de L-Selectina (CD62L), y de mayor expresión de perforina, indicando una diferenciación más eficaz a un fenotipo citotóxico. Estos datos sugieren que la deficiencia en DGK α contribuye a potenciar la respuesta a las señales de la IL-2, favoreciendo el programa transcripcional que regula tanto la expansión inicial como la posterior diferenciación de las poblaciones CTLs.

3. PAPEL DE LA DGK α EN LA RESPUESTA INMUNE Y TOLERANCIA EN TUMORES

Tras la observación de un fenotipo más citotóxico por parte de las células CD8 deficientes en DGK α se procedió a investigar la respuesta citotóxica *in vivo* de estos linfocitos. Elegimos un modelo tumoral para asegurar la existencia de un entorno anérgico, puesto que la anergia es un fenómeno de inducción temprana en el desarrollo tumoral (Staveley-O'Carroll et al., 1998). Empleamos la línea EL4 por su uso previo como modelo de inhibición de la respuesta citotóxica, debido a la anergia causada por el TGF- β secretado por este timoma

(Gorelik and Flavell, 2001; Thomas and Massague, 2005). Además, la observación de una alta expresión de *DGKA* en los linfocitos CD8 infiltrados en tumores (TILs) en carcinoma renal y su fenotipo anérgico, con reducida capacidad secretora de gránulos y fosforilación de ERK, junto con la reversión de dicho fenotipo tras la inhibición de la actividad DGK α (Prinz et al., 2012), sugería un papel importante de la DGK α en la anergia inducida por tumores.

Sin embargo, en contra de la hipótesis inicial, los datos obtenidos no sugerían una mejor respuesta inmune frente al tumor. Tras la inoculación intraperitoneal del tumor EL4 se observó menor supervivencia, junto con mayor crecimiento del tumor y menor celularidad del bazo, sugiriendo un continuo reclutamiento de linfocitos al tumor debido a una respuesta deficiente de los ratones deficientes para DGK α . Al inocular la misma línea tumoral de manera subcutánea, se obtuvieron similares resultados, con mayor crecimiento de tumor a día 21 y menor celularidad del bazo. El análisis de las células CD8 infiltradas reveló que, a pesar de que a tiempos tempranos de desarrollo del tumor existe un mayor infiltrado de linfocitos T CD8 deficientes para DGK α , la respuesta citotóxica no es mejor, finalizando en una respuesta CD8 efectora disminuida. Además, el menor número de células CD8 en el bazo de los ratones deficientes para DGK α sugiere el reclutamiento activo de células al tumor, como sucediera en el modelo intraperitoneal. La no modificación del fenotipo de las células CD8 en el bazo sugiere que la respuesta observada es debida al microambiente tumoral.

No se realizó el mismo modelo en ratones OT-I con células EL4 que sobreexpresan OVA (EG.7), ya que el objeto de estudio era proporcionar una intensidad baja de estimulación y así poder observar mejor las posibles diferencias entre grupos en la respuesta al tumor. Dicho modelo se realizó en los ratones OT-I deficientes para DGK ζ , obteniéndose mayor rechazo a los tumores por parte de los OT-I DGK $\zeta^{-/-}$ (Riese et al., 2011). En estos ratones también se observó que sus células CD8 tienen incrementada su capacidad de producción de IFN- γ , al igual que lo observado en los OT-I DGK $\alpha^{-/-}$, pero también más IL-2, fenómeno que no sucede en caso de los ratones OT-I DGK $\alpha^{-/-}$. Posiblemente estas diferencias radiquen en los diferentes mecanismos de regulación para ambas isoformas y/o la diferente naturaleza de las rutas que regulan, a pesar de que el análisis inicial de ratones deficientes para DGK α y DGK ζ sugería que ambas isoformas poseen funciones redundantes como reguladores negativos del programa de activación de linfocitos T (Olenchok et al., 2006; Zhong et al., 2003). Las células T de ambos modelos exhiben mayor proliferación en ausencia de señal coestimuladora, hiperactivación de la ruta de Ras/ERK y resistencia a la inducción de anergia.

Sin embargo, el fenotipo observado en los ratones OT-I DGK $\zeta^{-/-}$ frente a tumores EG.7 es similar al observado en los ratones deficientes en otra proteína relacionada con la regulación de la respuesta al TCR, anergia y tolerancia, Cbl-b (Jeon et al., 2004). Los tumores subcutáneos en ratones deficientes para Cbl-b presentan un incremento en el infiltrado de células CD8, resolviendo el 100% de los tumores EL4 y EG.7, siendo sus células CD8 resistentes al TGF- β *in*

vivo. El fenómeno de rechazo a tumores en estos ratones es independiente de la coestimulación, ya que los ratones dobles deficientes para CD28 y Cbl-b también resuelven los tumores EL4 (Chiang et al., 2007), separando la respuesta a la intensidad de la coestimulación frente a la sensibilidad al TGF- β . Las células CD8 de ratones deficientes para Cbl-b presentan resistencia al TGF- β *in vitro* en términos de producción de IFN- γ , junto con independencia de la coestimulación (Chiang et al., 2007) y respuesta incrementada frente al tumor EL4 intraperitoneal, relacionándolo con la resistencia al TGF- β secretado por el tumor (Wohlfert et al., 2006).

Experimentos preliminares de estimulación *in vitro* en el modelo OT-I tras las estimulación con OVA y TGF- β señalan que este fenómeno no ocurre en los ratones OT-I deficientes para DGK α (datos no mostrados), mostrando sensibilidad frente al TGF- β *in vitro* en términos de producción de IFN- γ . Además, la reciente identificación en el laboratorio de secuencias Smad de respuesta a TGF- β en el promotor de *Dgka* (Martinez-Moreno et al., 2012) apunta a la posibilidad de una posible respuesta diferencial al TGF- β secretado en el tumor, ya que experimentos preliminares en el modelo OT-I de diferenciación a CTLs con OVA en presencia de TGF- β muestran menor supervivencia de las CD8 deficientes para DGK α , fenómeno que no sucede en las CD8 WT (datos no mostrados). Este fenómeno quizás pudiera estar sucediendo en el microambiente tumoral, y relacionaría la deficiente respuesta de los linfocitos CD8 DGK $\alpha^{-/-}$ con el TGF- β secretado por el tumor. En relación con el TGF- β , la supervivencia de las células efectoras y la diferenciación a memoria, se ha descrito que tras la infección por *Listeria* se incrementa la producción de TGF- β , promoviendo la apoptosis de las células CD8 efectoras durante el proceso de expansión clonal y contracción, controlando así el número de células efectoras. En este modelo además comprueban que la IL-15 promueve la supervivencia en el proceso de contracción, para la posterior generación de células de memoria (Sanjabi et al., 2009). Actualmente, el papel del TGF- β y DGK α en la supervivencia de las CTLs, junto con la respuesta diferencial a las citoquinas IL-2, IL-7 e IL-15 en el proceso de diferenciación a memoria, son objeto de estudio en el laboratorio.

Otra hipótesis a valorar del defecto de respuesta CD8 al tumor por la falta de DGK α es que pueda ser debida a la observación de un fenotipo *helper* deficiente por parte de las células CD4 DGK $\alpha^{-/-}$. Se ha descrito en el modelo de infección por LCMV que las células CD8 deficientes para DGK α o DGK ζ expanden de una manera más eficaz en respuesta a la infección, con mayor producción de citoquinas, pero demuestran una respuesta secundaria reducida, sugiriendo un papel importante de las DGKs en la producción de una memoria efectora eficiente. La respuesta incrementada frente al virus LCMV es intrínseca a las células CD8 deficientes para DGK ζ , mientras que en los ratones deficientes en DGK α parece ser parcialmente extrínseca a las células CD8, separando los papeles de DGK α y DGK ζ en la generación de una adecuada respuesta de memoria efectora frente a virus (Shin et al., 2012).

Estas observaciones sugieren un posible papel de la DGK α en la actividad cooperadora de las células CD4, para la correcta generación de memoria efectora en las células CD8. Sin embargo, a pesar de que cáncer e infección crónica por virus son dos fenómenos que durante mucho tiempo han sido relacionados, porque en ambos se da la existencia de alta dosis de antígeno y un ambiente inmunosupresor, la principal diferencia radica en que los antígenos virales son generalmente exógenos y muy inmunogénicos, mientras que los antígenos tumorales son moléculas propias poco inmunogénicas, incluyendo los mecanismos de tolerancia periférica en este modelo (Kim and Ahmed, 2010), por lo que la tolerancia existente en el tumor añade un grado mayor de complejidad en el estudio.

El estudio detallado de las células CD4 infiltradas en los tumores EL4 a día 9 reveló que la respuesta Th1 en los ratones deficientes para DGK α observada fue menor, a pesar de existir mayor expresión de CD44, observando además dos niveles de expresión de FOXP3 en las células CD4⁺CD25⁺. El análisis del infiltrado linfocitario a día 21 reveló un incremento en las diferencias observadas a día 9, mientras que el análisis del bazo en los ratones deficientes para DGK α mostró menor número de células CD4, sugiriendo un reclutamiento activo de células CD4 hacia el tumor. La observación de una agudización de las diferencias de expresión de FOXP3 a día 21 sugiere una respuesta diferencial en la inducción y/o reclutamiento de células Treg en los ratones deficientes para DGK α . Por una parte se observó una población con mayor expresión de FOXP3, correlacionándose con menor respuesta efectora, ya que las Tregs reducen la respuesta anti-tumoral CD8 (Chen et al., 2005). Este fenómeno también se observa en los ratones deficientes para Cbl-b, donde hay más Treg en el microambiente tumoral. Sin embargo, en este modelo la respuesta efectora CD8 frente al tumor no puede ser suprimida por las Treg, atribuyéndose el fenómeno a las células CD8 efectoras (Chiang et al., 2007), ya que las Treg de los ratones deficientes en Cbl-b tienen capacidad supresora frente a las células efectoras WT pero no frente a las propias (Wohlfert et al., 2006). Además, los ratones deficientes para Cbl-b desarrollan autoinmunidad espontánea, junto con hiperactivación de sus células T (Bachmaier et al., 2000).

Se observó además en los ratones deficientes para DGK α una población CD4⁺CD25⁺ con menor expresión de FOXP3 que la observada en ratones WT en el microambiente tumoral. Se ha demostrado que las Treg limitan el acceso de las células CD8 a la IL-2 para que la generación de la memoria sea efectiva (de Goer de Herve et al., 2012), y alteran la avidéz de la respuesta primaria de las células CD8 (Pace et al., 2012), por lo que la expresión alterada de FOXP3 en los tumores de ratones deficientes en DGK α podría estar influyendo en la generación de la respuesta de las células CD8. A diferencia de lo observado con las células CD8, se observa una posible recirculación de células con reducida expresión de FOXP3 a bazo, ya que el MFI de FOXP3 en las células CD4⁺CD25⁺ está reducido en los bazos de los ratones deficientes para

DGK α portantes del tumor a día 21. Todos estos datos sugieren que DGK α altera la respuesta inmune frente a tumores, tanto en las células CD8 como en las células CD4.

4. PAPEL DE LA DGK α EN LA DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS CD4

El programa de diferenciación de las células CD4 es muy complejo, y numerosos estudios sugieren que la activación inicial es determinante en la posterior definición de los programas de diferenciación (Murphy and Stockinger, 2010). La existencia de DGK α como gen asociado a la población Treg en ratón y humano (Pfoertner et al., 2006), junto con la observación de que las células Treg de ratón presentan un fenotipo anérgico, y la reversión de este fenotipo tras la inhibición de DGK α o la adición de IL-2 (Hickman et al., 2006), sugiere un papel de la DGK α en la funcionalidad y generación de las células Treg.

Al observar que el desarrollo de las células Treg naturales en los ratones deficientes para DGK α y su capacidad supresora es efectiva, junto con la ausencia de síntomas de autoinmunidad, descartamos el papel de DGK α en el desarrollo de Treg naturales, centrándonos en la diferenciación de poblaciones CD4 efectoras y reguladoras tras la estimulación antigénica.

La inducción de células CD4 T efectoras a partir de células CD4⁺CD25⁻ mostró una disminución de la expresión de *Dgka* en respuesta a la activación. Estos resultados demuestran que el mecanismo de regulación transcripcional de *Dgka* está conservado en células CD4. Se observó además un aumento de la expresión de *Dgka* tras la inducción de células iTreg *in vitro* por TGF- β , que junto con la menor expresión de FOXP3 en respuesta a TGF- β en las células CD4 de los ratones deficientes para DGK α , confirma una regulación de la expresión de *Dgka* por el TGF- β y su papel en la inducción de células iTreg en periferia. Estos datos correlacionan con la reciente identificación de sitios SMAD en el promotor de *Dgka* (Martinez-Moreno et al., 2012).

Para la diferenciación hacia iTreg es necesaria la existencia de una señal de estimulación del TCR débil o bien una estimulación fisiológica en la que la dosis del antígeno sea baja, traducándose en una señal débil de la ruta de PI3K (Turner et al., 2009), mientras que la señal fuerte procedente de la coestimulación o la activación constitutiva de AKT lleva a una inducción disminuida de FOXP3 por TGF- β *in vitro* (Fu et al., 2004; Haxhinasto et al., 2008). El TGF- β disminuye la intensidad de la coestimulación para la correcta generación de iTreg (Delisle et al., 2013), y bloquea la diferenciación hacia el fenotipo Th1 mediante la inhibición de la expresión de T-bet (Gorelik, 2002). Existen además numerosas evidencias de la importancia de la atenuación de la ruta PI3K/AKT/FoxO en la polarización a células iTreg, en presencia o ausencia de TGF- β . La existencia de menor inducción *in vitro* de FOXP3 por el TGF- β en las células CD4 deficientes para Cbl-b mediada por FoxO, junto con el impedimento

de los ratones deficientes para FoxO1 y FoxO3 de suprimir la expresión de T-bet tras la estimulación de sus células CD4 en presencia de TGF- β (Harada et al., 2010; Kerdiles et al., 2010) relaciona la regulación de la intensidad de la señal de la activación de la ruta de PI3K con la generación de iTreg en presencia de TGF- β . Además, la inhibición de PI3K o mTOR potencia la expresión de FOXP3 en ausencia de TGF- β (Delgoffe et al., 2009; Sauer et al., 2008).

La observación de la mayor fosforilación de FoxO en las células CD4 de los ratones deficientes para DGK α polarizadas hacia células efectoras confirma el papel de la DGK α en la regulación de la intensidad de la señal mediada por FoxO en células CD4. Asimismo, la observación de un incremento en expresión de marcadores de activación y metabólicos tras la estimulación con bajas dosis de péptido OVA en los ratones OT-II DGK $\alpha^{-/-}$ es similar a lo observado en células CD8 OT-I con péptidos de baja afinidad, sugiriendo que la mayor intensidad de la señal activadora por la deficiencia de DGK α podría dar lugar a una deficiente estabilización de la expresión de FOXP3, contrarrestando la señal del TGF- β . En nuestro modelo, la hiperactivación de la ruta de Ras de las células CD4 deficientes para DGK α estaría influyendo en este fenómeno, ya que tras inhibir la ruta de MEK se recupera la inducción de FOXP3 *in vitro*.

Esta polarización deficiente hacia iTreg debido a la señal de activación del TCR se confirma con el análisis de citoquinas en el modelo OT-II, observando que la ventaja proliferativa de las células como resultado de la falta de DGK α se traduce en mayor producción de IFN- γ , cuya secreción está unida al ciclo celular (Bird et al., 1998). Dicha ventaja se observa independientemente de la presencia o ausencia de TGF- β , pero sin resultar en una resistencia al TGF- β , sino más bien como consecuencia de la ventaja proliferativa de las células deficientes en DGK α . Además, se observa tras la activación del TCR una mayor producción de IL-2 por parte de las células OT-II de DGK $\alpha^{-/-}$, que posteriormente es frenada por la alta producción de IFN- γ , condicionando los procesos de diferenciación posterior y limitando la expresión del factor de transcripción FOXP3.

En este análisis se muestra de nuevo la divergencia con el modelo de ratón deficiente para Cbl-b, ya que sus células CD4 a pesar de mostrar proliferación incrementada tras la estimulación del TCR y ser independientes de la coestimulación, producen mayores niveles de IL-2, pero no IFN- γ (Bachmaier et al., 2000; Chiang et al., 2000). Esta diferencia se une al hecho de que, aunque sus poblaciones de Treg naturales permanecen intactas, no pueden suprimir a las células T CD4 efectoras a pesar de ser funcionales, fenómeno que no sucede por la deficiencia de DGK α . Además, las células T CD4 efectoras de los ratones deficientes para Cbl-b son resistentes a la acción del TGF- β (Wohlfert et al., 2004), mientras que las células CD4 deficientes para DGK α no muestran resistencia al TGF- β .

Un dato intrigante obtenido del análisis de citoquinas en sobrenadantes en el modelo OT-II fue la observación de mayor secreción de las citoquinas IL-10 e IL-17 tras la estimulación con OVA en los ratones deficientes para DGK α . Tras el tratamiento con TGF- β la secreción de IL-10 aumentó en los dos grupos, observándose reducción en la IL-17 secretada en ambos grupos, pero manteniéndose la ventaja en secreción en las células de ratones DGK $\alpha^{-/-}$.

Las células Th17 se generan por la acción de la señalización del TGF- β vía Smad (Malhotra et al., 2010). La inhibición del eje PI3K-AKT-mTORC1 en células T lleva a una disminución de la generación de células Th17 (Kurebayashi et al., 2012), relacionando la intensidad del estímulo recibido con la mayor secreción de IL-17 por la ausencia de DGK α . Existen evidencias de que la señalización alterada de mTORC1 da lugar a una deficiente respuesta Th1 y Th17 tanto *in vivo* como *in vitro*, señalando una vía común de diferenciación de las células Th1 y Th17, y relacionándolo con la intensidad de la señal de AKT (Delgoffe et al., 2011). Los resultados obtenidos en el modelo OT-II sugieren que la mayor producción de IFN- γ en cada división termina inhibiendo la expresión de IL-17 en los ratones DGK $\alpha^{-/-}$, tanto en presencia como en ausencia de TGF- β , favoreciendo un linaje Th1 frente a un Th17. Nuestros resultados indican que la regulación de la expresión de la DGK α por el eje PI3K/AKT puede ser importante en la regulación de las poblaciones Th1 y Th17.

La IL-2 es una citoquina implicada en la diferenciación de las Th17, ya que una secreción alta de IL-2 inhibe la generación de este linaje (Laurence et al., 2007; Stockinger, 2007). Sin embargo, observamos que en las divisiones en las que existe gran producción de IL-2, la expresión de IL-17 no está disminuida en los linfocitos CD4 deficientes para DGK α . Estos resultados relacionan más estrechamente la inhibición de la expresión de IL-17 por la alta expresión de IFN- γ en la deficiencia de DGK α . Además, revelan la importancia de la regulación de la expresión de la DGK α en el control de las primeras divisiones de las células CD4 y el efecto que la secreción inicial de IFN- γ tiene en la diferenciación de estas células. En el laboratorio actualmente se está estudiando la implicación de la DGK α en la regulación de la diferenciación de las células CD4 *in vitro* tras la inhibición de la polarización a un linaje Th1, mediante la neutralización del IFN- γ secretado.

La observación de mayor secreción de IL-10 tras la estimulación del TCR en los ratones OT-II deficientes para DGK α , y el aumento de su secreción en presencia de TGF- β en detrimento de la secreción de IL-17, sugiere la existencia de una posible diferenciación a poblaciones FOXP3 $^{-}$ IL-10 $^{+}$ (Tr1). Las células Tr1 son células reguladoras identificadas por su perfil de expresión de citoquinas, consistente en altos niveles de IL-10, TGF- β , bajos niveles de IL-2, y niveles variables de IL-4 e IFN- γ (Groux et al., 1997). Además, estas células no necesitan niveles altos de CD25 para generarse (Levings et al., 2005), dato observado a tiempo final en la inducción a iTreg en el modelo OT-II DGK $\alpha^{-/-}$. La IL-10 es fundamental en la diferenciación de las Tr1, pero no se pueden expandir en su presencia, mientras que la IL-27 y

el TGF- β además de servir como factores de diferenciación promueven su expansión (Awasthi et al., 2007; Stumhofer et al., 2007). La IL-27 promueve la inducción de IL-10 a través de STAT1 para dar lugar a una población IFN- γ^+ IL-10 $^+$ FOXP3 $^-$ (Batten et al., 2008). Asimismo, la IL-27 suprime el desarrollo de las células Th17 (Pot et al., 2011).

A pesar de que cada uno de los linajes Th necesita de la activación de diferentes STATs para su diferenciación, es necesaria una señal fuerte de activación del TCR y fosforilación de ERK para la producción de IL-10 en todos los linajes Th, y así poder controlar respuestas inmunes exageradas (Saraiva et al., 2009). La mayor producción de IL-10 en el modelo OT-II DGK $\alpha^{-/-}$ estaría de acuerdo con el requerimiento de la ruta Ras/ERK para la inducción de esta citoquina. Un experimento realizado en el laboratorio de polarización a células T efectoras y iTreg en el modelo OT-II reveló la producción de un aumento en el porcentaje de células IL-10 $^+$ y células IL17 $^+$ tras la estimulación con OVA en los ratones DGK α frente a los WT, mientras que en presencia de TGF- β se observa en los ratones OT-II DGK $\alpha^{-/-}$ un aumento de células en IL-10 $^+$ IL-17 $^+$, e IL-10 $^+$ en detrimento de la población IL-17 $^+$ (datos no mostrados), sugiriendo que la hiperactivación de la ruta de Ras por la deficiencia de DGK α está favoreciendo la producción de células con fenotipo regulador FOXP3 $^-$ IL-10 $^+$.

Además, se ha descrito que las células T reguladoras FOXP3 $^+$ y FOXP3 $^-$ son capaces de controlar la generación de las poblaciones Th17 y Th17 $^+$ Th1 *in vivo* (Huber et al., 2011). Estos datos, junto con la observación de que la expresión de IL-10 en células tumorales se correlaciona con el crecimiento tumoral (Itakura et al., 2011), y la existencia de remisión del crecimiento tumoral tras la inhibición de la ruta de p38 MAPK en un tumor con alta proporción de células IL-10 $^+$ en ausencia de Treg (Ohkusu-Tsukada et al., 2010) nos ha llevado a pensar en la posibilidad de que las células FOXP3 $^-$ presentes en los tumores puedan ser células Tr1.

5. DGK α EN LA REGULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE

Las señales procedentes de la PI3K y de las rutas dependientes del DAG deben de funcionar en conjunto y adecuadamente, para garantizar una correcta diferenciación de las células T. La regulación de los niveles de DGK α por la ruta de AKT/FoxO tanto en células CD4 como en células CD8 sugiere un mecanismo general que permite acoplar la activación del eje Ras/ERK en función de la intensidad de las señales de la PI3K. Este modelo está de acuerdo con resultados previos que han demostrado que la fosforilación de ERK mediada por el TCR necesita de una función correcta de la PI3K, ya que la expresión de su subunidad p110 δ catalíticamente inactiva da lugar a una menor fosforilación de ERK (Okkenhaug et al., 2002).

Asimismo, la regulación transcripcional de *Dgka* por la señal fuerte del TCR procedente de la coestimulación puede no ser el único mecanismo que contribuye a inhibir las funciones de

esta isoforma. Estudios recientes en células Jurkat han demostrado la inhibición de la actividad $DGK\alpha$ tras coestimulación por el CD28 o la proteína adaptadora SAP (Signaling lymphocyte activation molecule (SLAM)-Associated Protein) (Baldanzi et al., 2011). Estos experimentos refuerzan la importancia de la regulación de la actividad de $DGK\alpha$ para la correcta activación de las células T y sugieren además que inhibir la $DGK\alpha$ podría ser de interés terapéutico en el tratamiento de las inmunodeficiencias causadas por la pérdida de SLAM, en las que se observan defectos en la señalización temprana del TCR (Sanzone et al., 2003). Además, la regulación negativa de la $DGK\alpha$ por las señales de PI3K/AKT proporciona a los linfocitos T de un mecanismo que podría ayudar a discriminar la intensidad de las señales recibidas de las células por el entorno de citoquinas. La atenuación de la expresión de *Dgka* por IL-2 favorecería la inducción de respuestas Th1 o citotóxicas, mientras que la inducción de su expresión por citoquinas como el TGF- β ayudaría a limitar la señal antigénica, favoreciendo el desarrollo de poblaciones con actividad reguladora (Fig 43).

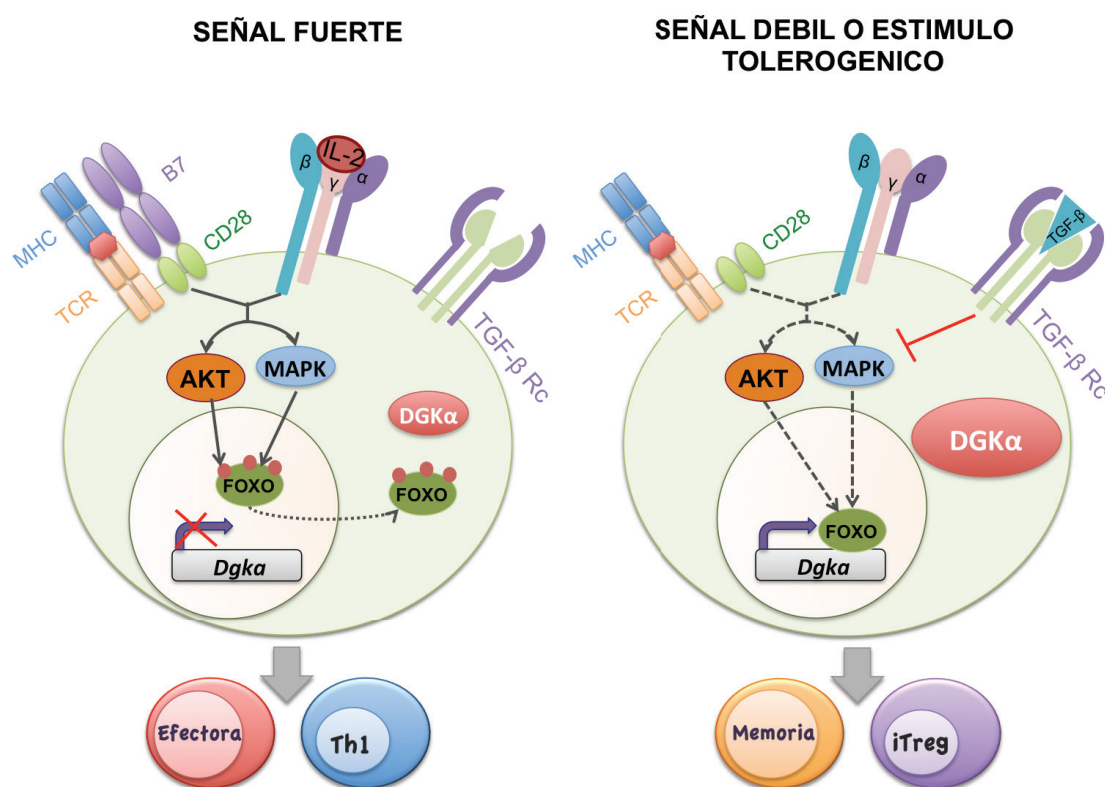


Figura 43. Modelo de la regulación de la $DGK\alpha$ en la respuesta inmune y la diferenciación de las células T. Las señales fuertes procedentes de la activación del TCR o de la IL-2 (izda) favorecen la activación de las rutas de las MAPK y AKT, dando lugar a mayor fosforilación de FoxO, que sale del núcleo y deja de transcribirse *Dgka*, favoreciéndose la aparición de un fenotipo CD8 efector o Th1. Sin embargo, las señales débiles procedentes del TCR en ausencia de coestimulación, la ausencia de señalización por IL-2 o las señales tolerogénicas procedentes del TGF- β (dcha) mantienen baja la intensidad de la señal de las rutas de AKT y MAPK, fomentando la unión de FoxO al DNA y con ello la transcripción de *DGK\alpha*. De esta manera, se favorece la generación de poblaciones de memoria (señal débil) o iTreg (TGF- β).

Nuestros resultados además ayudan a entender mejor la función de la DGK α en el mantenimiento de estados anérgicos. La anergia, como resultado de la falta de coestimulación, resultaría en altos niveles de expresión de DGK α limitando la activación de Ras/ERK. La regulación de DGK α por las señales de IL-2 ayuda a entender la razón por la que el estado anérgico se resuelve por la adición de IL-2 exógena. Además, la bajada de expresión de *Dgka* mediada por la IL-2 coincide con implicación de la activación de la ruta de AKT en el rescate de las células anérgicas a través de la IL-2 (Dure and Macian, 2009).

CONCLUSIONES

1. La DGK α contribuye a regular la ruta de Ras/ERK metabolizando el DAG que se produce durante la activación antigénica. Su contribución a la actividad DGK total en órganos linfoides en estado basal es baja, lo cual está de acuerdo con su localización citosólica en ausencia de activación. La deficiencia de DGK α no afecta a la expresión de otras isoformas en estado basal.
2. Tras la estimulación del TCR en ausencia de coestimulación, los linfocitos T CD8 deficientes en DGK α alcanzan una inducción de CD69 cercana a la observada en los linfocitos CD8 WT por la coestimulación. Sin embargo, la expresión de CD25 así como de marcadores metabólicos, aunque mayor que en los linfocitos CD8 WT, no alcanza el nivel obtenido por la coestimulación en ratones WT. La ausencia de DGK α favorece la expansión y diferenciación a células citotóxicas por la IL-2.
3. Los linfocitos T CD4 deficientes para DGK α no exhiben un fenotipo detectable de independencia de la señal coestimuladora en términos de parámetros de activación. Sin embargo, al igual que las células CD8, muestran mayor secreción de IFN- γ *in vitro*, junto con una proliferación más robusta en respuesta a la IL-2, a pesar de no existir mayor producción de ésta.
4. Las señales de intensidad fuerte procedentes de la coestimulación y de la IL-2, producen una fosforilación del Factor de transcripción FoxO, lo que se traduce en una inhibición transcripcional de *Dgka* tanto en linfocitos CD4 como en CD8. Las señales tolerogénicas, como las proporcionadas por el TGF- β , favorecen la transcripción de *Dgka*, que atenúa la activación de la ruta de Ras/ERK.
5. La ausencia de DGK α conduce a una hiperactivación de la ruta de Ras/ERK que limita la generación de células T reguladoras FOXP3⁺ inducidas por TGF- β *in vitro*. La población de células T reguladoras naturales no se muestra afectada por la deficiencia de DGK α .
6. A pesar de su caracterización inicial como un gen de respuesta a anergia, la respuesta inmune *in vivo* frente a un tumor con alta secreción de TGF- β se ve reducida en ausencia de DGK α . El análisis de las células infiltradas en el tumor revela la existencia un fenotipo alterado tanto de las células CD8 como CD4.
7. La disminución en la expresión de *Dgka* es importante para favorecer la diferenciación hacia poblaciones T efectoras, mientras que su expresión es necesaria para el establecimiento de poblaciones tanto de memoria efectora como con actividad reguladora.

REFERENCIAS

- Abbas, A.K. (2003). The control of T cell activation vs. tolerance. *Autoimmunity reviews* 2, 115-118.
- Ahmed, R., and Gray, D. (1996). Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science* 272, 54-60.
- Amadi-Obi, A., Yu, C.R., Liu, X., Mahdi, R.M., Clarke, G.L., Nussenblatt, R.B., Gery, I., Lee, Y.S., and Egwuagu, C.E. (2007). TH17 cells contribute to uveitis and scleritis and are expanded by IL-2 and inhibited by IL-27/STAT1. *Nature medicine* 13, 711-718.
- Awasthi, A., Carrier, Y., Peron, J.P., Bettelli, E., Kamanaka, M., Flavell, R.A., Kuchroo, V.K., Oukka, M., and Weiner, H.L. (2007). A dominant function for interleukin 27 in generating interleukin 10-producing anti-inflammatory T cells. *Nature immunology* 8, 1380-1389.
- Bacchiocchi, R., Baldanzi, G., Carbonari, D., Capomagi, C., Colombo, E., van Blitterswijk, W.J., Graziani, A., and Fazioli, F. (2005). Activation of alpha-diacylglycerol kinase is critical for the mitogenic properties of anaplastic lymphoma kinase. *Blood* 106, 2175-2182.
- Bachmaier, K., Krawczyk, C., Kozieradzki, I., Kong, Y.Y., Sasaki, T., Oliveira-dos-Santos, A., Mariathasan, S., Bouchard, D., Wakeham, A., Itie, A., *et al.* (2000). Negative regulation of lymphocyte activation and autoimmunity by the molecular adaptor Cbl-b. *Nature* 403, 211-216.
- Bachmann, M.F., Kohler, G., Ecabert, B., Mak, T.W., and Kopf, M. (1999). Cutting edge: lymphoproliferative disease in the absence of CTLA-4 is not T cell autonomous. *J Immunol* 163, 1128-1131.
- Bachmann, M.F., Wolint, P., Schwarz, K., Jager, P., and Oxenius, A. (2005). Functional properties and lineage relationship of CD8⁺ T cell subsets identified by expression of IL-7 receptor alpha and CD62L. *J Immunol* 175, 4686-4696.
- Baldanzi, G., Cutrupi, S., Chianale, F., Gnocchi, V., Rainero, E., Porporato, P., Filigheddu, N., van Blitterswijk, W.J., Parolini, O., Bussolino, F., *et al.* (2008). Diacylglycerol kinase-alpha phosphorylation by Src on Y335 is required for activation, membrane recruitment and Hgf-induced cell motility. *Oncogene* 27, 942-956.
- Baldanzi, G., Pighini, A., Bettio, V., Rainero, E., Traini, S., Chianale, F., Porporato, P.E., Filigheddu, N., Mesturini, R., Song, S., *et al.* (2011). SAP-mediated inhibition of diacylglycerol kinase alpha regulates TCR-induced diacylglycerol signaling. *J Immunol* 187, 5941-5951.
- Barnden, M.J., Allison, J., Heath, W.R., and Carbone, F.R. (1998). Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based alpha- and beta-chain genes under the control of heterologous regulatory elements. *Immunology and cell biology* 76, 34-40.
- Barry, M., and Bleackley, R.C. (2002). Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nature reviews Immunology* 2, 401-409.
- Batten, M., Kljavin, N.M., Li, J., Walter, M.J., de Sauvage, F.J., and Ghilardi, N. (2008). Cutting edge: IL-27 is a potent inducer of IL-10 but not FoxP3 in murine T cells. *J Immunol* 180, 2752-2756.

- Bennett, C.L., Christie, J., Ramsdell, F., Brunkow, M.E., Ferguson, P.J., Whitesell, L., Kelly, T.E., Saulsbury, F.T., Chance, P.F., and Ochs, H.D. (2001). The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nature genetics* 27, 20-21.
- Bensinger, S.J., Bandeira, A., Jordan, M.S., Caton, A.J., and Laufer, T.M. (2001). Major histocompatibility complex class II-positive cortical epithelium mediates the selection of CD4(+)25(+) immunoregulatory T cells. *The Journal of experimental medicine* 194, 427-438.
- Bird, J.J., Brown, D.R., Mullen, A.C., Moskowitz, N.H., Mahowald, M.A., Sider, J.R., Gajewski, T.F., Wang, C.R., and Reiner, S.L. (1998). Helper T cell differentiation is controlled by the cell cycle. *Immunity* 9, 229-237.
- Bopp, T., Becker, C., Klein, M., Klein-Hessling, S., Palmetshofer, A., Serfling, E., Heib, V., Becker, M., Kubach, J., Schmitt, S., *et al.* (2007). Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *The Journal of experimental medicine* 204, 1303-1310.
- Borland, G., Ross, J.A., and Guy, K. (1998). Forms and functions of CD44. *Immunology* 93, 139-148.
- Borsellino, G., Kleinewietfeld, M., Di Mitri, D., Sternjak, A., Diamantini, A., Giometto, R., Hopner, S., Centonze, D., Bernardi, G., Dell'Acqua, M.L., *et al.* (2007). Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3⁺ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood* 110, 1225-1232.
- Boyman, O., and Sprent, J. (2012). The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nature reviews Immunology* 12, 180-190.
- Boyton, R.J., and Altmann, D.M. (2002). Is selection for TCR affinity a factor in cytokine polarization? *Trends in immunology* 23, 526-529.
- Bream, J.H., Hodge, D.L., Gonsky, R., Spolski, R., Leonard, W.J., Krebs, S., Targan, S., Morinobu, A., O'Shea, J.J., and Young, H.A. (2004). A distal region in the interferon-gamma gene is a site of epigenetic remodeling and transcriptional regulation by interleukin-2. *The Journal of biological chemistry* 279, 41249-41257.
- Brunkow, M.E., Jeffery, E.W., Hjerrild, K.A., Paeper, B., Clark, L.B., Yasayko, S.A., Wilkinson, J.E., Galas, D., Ziegler, S.F., and Ramsdell, F. (2001). Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nature genetics* 27, 68-73.
- Burchill, M.A., Yang, J., Vogtenhuber, C., Blazar, B.R., and Farrar, M.A. (2007). IL-2 receptor beta-dependent STAT5 activation is required for the development of Foxp3⁺ regulatory T cells. *J Immunol* 178, 280-290.
- Cai, J., Abramovici, H., Gee, S.H., and Topham, M.K. (2009). Diacylglycerol kinases as sources of phosphatidic acid. *Biochimica et biophysica acta* 1791, 942-948.
- Cantor, J., Slepak, M., Ege, N., Chang, J.T., and Ginsberg, M.H. (2011). Loss of T cell CD98 H chain specifically ablates T cell clonal expansion and protects from autoimmunity. *J Immunol* 187, 851-860.

- Carrasco, S., and Merida, I. (2004). Diacylglycerol-dependent binding recruits PKC θ and RasGRP1 C1 domains to specific subcellular localizations in living T lymphocytes. *Molecular biology of the cell* *15*, 2932-2942.
- Carrio, R., Bathe, O.F., and Malek, T.R. (2004). Initial antigen encounter programs CD8 $^{+}$ T cells competent to develop into memory cells that are activated in an antigen-free, IL-7- and IL-15-rich environment. *J Immunol* *172*, 7315-7323.
- Chang, S., and Aune, T.M. (2005). Histone hyperacetylated domains across the Ifng gene region in natural killer cells and T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *102*, 17095-17100.
- Chao, C.C., Jensen, R., and Dailey, M.O. (1997). Mechanisms of L-selectin regulation by activated T cells. *J Immunol* *159*, 1686-1694.
- Chen, M.L., Pittet, M.J., Gorelik, L., Flavell, R.A., Weissleder, R., von Boehmer, H., and Khazaie, K. (2005). Regulatory T cells suppress tumor-specific CD8 T cell cytotoxicity through TGF- β signals in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *102*, 419-424.
- Chen, Q., Kim, Y.C., Laurence, A., Punkosdy, G.A., and Shevach, E.M. (2011). IL-2 controls the stability of Foxp3 expression in TGF- β -induced Foxp3 $^{+}$ T cells in vivo. *J Immunol* *186*, 6329-6337.
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K.J., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., and Wahl, S.M. (2003). Conversion of peripheral CD4 $^{+}$ CD25 $^{-}$ naive T cells to CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ regulatory T cells by TGF- β induction of transcription factor Foxp3. *The Journal of experimental medicine* *198*, 1875-1886.
- Chen, Z., Laurence, A., and O'Shea, J.J. (2007). Signal transduction pathways and transcriptional regulation in the control of Th17 differentiation. *Seminars in immunology* *19*, 400-408.
- Chiang, J.Y., Jang, I.K., Hodes, R., and Gu, H. (2007). Ablation of Cbl-b provides protection against transplanted and spontaneous tumors. *The Journal of clinical investigation* *117*, 1029-1036.
- Chiang, Y.J., Kole, H.K., Brown, K., Naramura, M., Fukuhara, S., Hu, R.J., Jang, I.K., Gutkind, J.S., Shevach, E., and Gu, H. (2000). Cbl-b regulates the CD28 dependence of T-cell activation. *Nature* *403*, 216-220.
- Clarke, S.L., Betts, G.J., Plant, A., Wright, K.L., El-Shanawany, T.M., Harrop, R., Torkington, J., Rees, B.I., Williams, G.T., Gallimore, A.M., *et al.* (2006). CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ FOXP3 $^{+}$ regulatory T cells suppress anti-tumor immune responses in patients with colorectal cancer. *PloS one* *1*, e129.
- Coudronniere, N., Villalba, M., Englund, N., and Altman, A. (2000). NF- κ B activation induced by T cell receptor/CD28 costimulation is mediated by protein kinase C- θ . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *97*, 3394-3399.
- Cousens, L.P., Orange, J.S., and Biron, C.A. (1995). Endogenous IL-2 contributes to T cell expansion and IFN- γ production during lymphocytic choriomeningitis virus infection. *J Immunol* *155*, 5690-5699.

Cutrupi, S., Baldanzi, G., Gramaglia, D., Maffe, A., Schaap, D., Giraudo, E., van Blitterswijk, W., Bussolino, F., Comoglio, P.M., and Graziani, A. (2000). Src-mediated activation of alpha-diacylglycerol kinase is required for hepatocyte growth factor-induced cell motility. *The EMBO journal* 19, 4614-4622.

D'Ambrosio, D., Cantrell, D.A., Frati, L., Santoni, A., and Testi, R. (1994). Involvement of p21ras activation in T cell CD69 expression. *European journal of immunology* 24, 616-620.

Daniels, M.A., Teixeira, E., Gill, J., Hausmann, B., Roubaty, D., Holmberg, K., Werlen, G., Hollander, G.A., Gascoigne, N.R., and Palmer, E. (2006). Thymic selection threshold defined by compartmentalization of Ras/MAPK signalling. *Nature* 444, 724-729.

David, H. (1988). Rudolf Virchow and modern aspects of tumor pathology. *Pathology, research and practice* 183, 356-364.

Davidson, T.S., DiPaolo, R.J., Andersson, J., and Shevach, E.M. (2007). Cutting Edge: IL-2 is essential for TGF-beta-mediated induction of Foxp3+ T regulatory cells. *J Immunol* 178, 4022-4026.

de Goer de Herve, M.G., Jaafoura, S., Vallee, M., and Taoufik, Y. (2012). FoxP3(+) regulatory CD4 T cells control the generation of functional CD8 memory. *Nature communications* 3, 986.

Delgoffe, G.M., Kole, T.P., Zheng, Y., Zarek, P.E., Matthews, K.L., Xiao, B., Worley, P.F., Kozma, S.C., and Powell, J.D. (2009). The mTOR kinase differentially regulates effector and regulatory T cell lineage commitment. *Immunity* 30, 832-844.

Delgoffe, G.M., Pollizzi, K.N., Waickman, A.T., Heikamp, E., Meyers, D.J., Horton, M.R., Xiao, B., Worley, P.F., and Powell, J.D. (2011). The kinase mTOR regulates the differentiation of helper T cells through the selective activation of signaling by mTORC1 and mTORC2. *Nature immunology* 12, 295-303.

Delisle, J.S., Giroux, M., Boucher, G., Landry, J.R., Hardy, M.P., Lemieux, S., Jones, R.G., Wilhelm, B.T., and Perreault, C. (2013). The TGF-beta-Smad3 pathway inhibits CD28-dependent cell growth and proliferation of CD4 T cells. *Genes and immunity*.

Deves, R., and Boyd, C.A. (2000). Surface antigen CD98(4F2): not a single membrane protein, but a family of proteins with multiple functions. *The Journal of membrane biology* 173, 165-177.

Ding, L., McIntyre, T.M., Zimmerman, G.A., and Prescott, S.M. (1998). The cloning and developmental regulation of murine diacylglycerol kinase zeta. *FEBS letters* 429, 109-114.
Dure, M., and Macian, F. (2009). IL-2 signaling prevents T cell anergy by inhibiting the expression of anergy-inducing genes. *Molecular immunology* 46, 999-1006.

Ermann, J., Szanya, V., Ford, G.S., Paragas, V., Fathman, C.G., and Lejon, K. (2001). CD4(+)CD25(+) T cells facilitate the induction of T cell anergy. *J Immunol* 167, 4271-4275.

Ernst, P.B., Garrison, J.C., and Thompson, L.F. (2010). Much ado about adenosine: adenosine synthesis and function in regulatory T cell biology. *J Immunol* 185, 1993-1998.

- Fahlen, L., Read, S., Gorelik, L., Hurst, S.D., Coffman, R.L., Flavell, R.A., and Powrie, F. (2005). T cells that cannot respond to TGF-beta escape control by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *The Journal of experimental medicine* 201, 737-746.
- Fang, D., and Liu, Y.C. (2001). Proteolysis-independent regulation of PI3K by Cbl-b-mediated ubiquitination in T cells. *Nature immunology* 2, 870-875.
- Fantini, M.C., Becker, C., Tubbe, I., Nikolaev, A., Lehr, H.A., Galle, P., and Neurath, M.F. (2006). Transforming growth factor beta induced FoxP3+ regulatory T cells suppress Th1 mediated experimental colitis. *Gut* 55, 671-680.
- Fontenot, J.D., Gavin, M.A., and Rudensky, A.Y. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nature immunology* 4, 330-336.
- Fontenot, J.D., Rasmussen, J.P., Gavin, M.A., and Rudensky, A.Y. (2005). A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nature immunology* 6, 1142-1151.
- Fox, C.J., Hammerman, P.S., and Thompson, C.B. (2005). Fuel feeds function: energy metabolism and the T-cell response. *Nature reviews Immunology* 5, 844-852.
- Friedmann, M.C., Migone, T.S., Russell, S.M., and Leonard, W.J. (1996). Different interleukin 2 receptor beta-chain tyrosines couple to at least two signaling pathways and synergistically mediate interleukin 2-induced proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 2077-2082.
- Fu, S., Zhang, N., Yopp, A.C., Chen, D., Mao, M., Chen, D., Zhang, H., Ding, Y., and Bromberg, J.S. (2004). TGF-beta induces Foxp3 + T-regulatory cells from CD4 + CD25 - precursors. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 4, 1614-1627.
- Fuller, M.J., and Zajac, A.J. (2003). Ablation of CD8 and CD4 T cell responses by high viral loads. *J Immunol* 170, 477-486.
- Garcon, F., Patton, D.T., Emery, J.L., Hirsch, E., Rottapel, R., Sasaki, T., and Okkenhaug, K. (2008). CD28 provides T-cell costimulation and enhances PI3K activity at the immune synapse independently of its capacity to interact with the p85/p110 heterodimer. *Blood* 111, 1464-1471.
- Gays, F., Unnikrishnan, M., Shrestha, S., Fraser, K.P., Brown, A.R., Tristram, C.M., Chrzanowska-Lightowlers, Z.M., and Brooks, C.G. (2000). The mouse tumor cell lines EL4 and RMA display mosaic expression of NK-related and certain other surface molecules and appear to have a common origin. *J Immunol* 164, 5094-5102.
- Genot, E., and Cantrell, D.A. (2000). Ras regulation and function in lymphocytes. *Current opinion in immunology* 12, 289-294.
- Gharbi, S.I., Avila-Flores, A., Soutar, D., Orive, A., Koretzky, G.A., Albar, J.P., and Merida, I. (2013). Transient PKCalpha shuttling to the immunological synapse is governed by (DGK)zeta and regulates L-selectin shedding. *Journal of cell science*.
- Gharbi, S.I., Rincon, E., Avila-Flores, A., Torres-Ayuso, P., Almena, M., Cobos, M.A., Albar, J.P., and Merida, I. (2011). Diacylglycerol kinase zeta controls diacylglycerol metabolism at the immunological synapse. *Molecular biology of the cell* 22, 4406-4414.

- Gorelik, L. (2002). Mechanism of Transforming Growth Factor beta-induced Inhibition of T Helper Type 1 Differentiation. *Journal of Experimental Medicine* 195, 1499-1505.
- Gorelik, L., and Flavell, R.A. (2001). Immune-mediated eradication of tumors through the blockade of transforming growth factor-beta signaling in T cells. *Nature medicine* 7, 1118-1122.
- Goto, K., and Kondo, H. (1996). Heterogeneity of diacylglycerol kinase in terms of molecular structure, biochemical characteristics and gene expression localization in the brain. *J Lipid Mediat Cell Signal* 14, 251-257.
- Greenwald, R.J., Boussiotis, V.A., Liorbach, R.B., Abbas, A.K., and Sharpe, A.H. (2001). CTLA-4 regulates induction of anergy in vivo. *Immunity* 14, 145-155.
- Grohmann, U., Orabona, C., Fallarino, F., Vacca, C., Calcinaro, F., Falorni, A., Candeloro, P., Belladonna, M.L., Bianchi, R., Fioretti, M.C., *et al.* (2002). CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nature immunology* 3, 1097-1101.
- Groux, H., O'Garra, A., Bigler, M., Rouleau, M., Antonenko, S., de Vries, J.E., and Roncarolo, M.G. (1997). A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389, 737-742.
- Gubbels Bupp, M.R., Edwards, B., Guo, C., Wei, D., Chen, G., Wong, B., Masteller, E., and Peng, S.L. (2009). T cells require Foxo1 to populate the peripheral lymphoid organs. *European journal of immunology* 39, 2991-2999.
- Guo, R., Wan, C.K., Carpenter, J.H., Mousallem, T., Boustany, R.M., Kuan, C.T., Burks, A.W., and Zhong, X.P. (2008). Synergistic control of T cell development and tumor suppression by diacylglycerol kinase alpha and zeta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 11909-11914.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.
- Harada, Y., Harada, Y., Elly, C., Ying, G., Paik, J.H., DePinho, R.A., and Liu, Y.C. (2010). Transcription factors Foxo3a and Foxo1 couple the E3 ligase Cbl-b to the induction of Foxp3 expression in induced regulatory T cells. *The Journal of experimental medicine* 207, 1381-1391.
- Hatton, R.D., Harrington, L.E., Luther, R.J., Wakefield, T., Janowski, K.M., Oliver, J.R., Lallone, R.L., Murphy, K.M., and Weaver, C.T. (2006). A distal conserved sequence element controls Ifng gene expression by T cells and NK cells. *Immunity* 25, 717-729.
- Haxhinasto, S., Mathis, D., and Benoist, C. (2008). The AKT-mTOR axis regulates de novo differentiation of CD4+Foxp3+ cells. *The Journal of experimental medicine* 205, 565-574.
- Healy, A.M., Izmailova, E., Fitzgerald, M., Walker, R., Hattersley, M., Silva, M., Siebert, E., Terkelsen, J., Picarella, D., Pickard, M.D., *et al.* (2006). PKC-theta-deficient mice are protected from Th1-dependent antigen-induced arthritis. *J Immunol* 177, 1886-1893.
- Hickman, S.P., Yang, J., Thomas, R.M., Wells, A.D., and Turka, L.A. (2006). Defective activation of protein kinase C and Ras-ERK pathways limits IL-2 production and proliferation by CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 177, 2186-2194.

- Hogquist, K.A., Jameson, S.C., Heath, W.R., Howard, J.L., Bevan, M.J., and Carbone, F.R. (1994). T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* 76, 17-27.
- Hokin, L.E., and Hokin, M.R. (1959). Diglyceride phosphokinase: an enzyme which catalyzes the synthesis of phosphatidic acid. *Biochimica et biophysica acta* 31, 285-287.
- Huber, S., Gagliani, N., Esplugues, E., O'Connor, W., Jr., Huber, F.J., Chaudhry, A., Kamanaka, M., Kobayashi, Y., Booth, C.J., Rudensky, A.Y., *et al.* (2011). Th17 cells express interleukin-10 receptor and are controlled by Foxp3(-) and Foxp3+ regulatory CD4+ T cells in an interleukin-10-dependent manner. *Immunity* 34, 554-565.
- Hwang, E.S., Hong, J.H., and Glimcher, L.H. (2005a). IL-2 production in developing Th1 cells is regulated by heterodimerization of RelA and T-bet and requires T-bet serine residue 508. *The Journal of experimental medicine* 202, 1289-1300.
- Hwang, E.S., Szabo, S.J., Schwartzberg, P.L., and Glimcher, L.H. (2005b). T helper cell fate specified by kinase-mediated interaction of T-bet with GATA-3. *Science* 307, 430-433.
- Isakov, N., and Altman, A. (2012). PKC-theta-mediated signal delivery from the TCR/CD28 surface receptors. *Frontiers in immunology* 3, 273.
- Itakura, E., Huang, R.R., Wen, D.R., Paul, E., Wunsch, P.H., and Cochran, A.J. (2011). IL-10 expression by primary tumor cells correlates with melanoma progression from radial to vertical growth phase and development of metastatic competence. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 24, 801-809.
- Janardhan, S.V., Praveen, K., Marks, R., and Gajewski, T.F. (2011). Evidence implicating the Ras pathway in multiple CD28 costimulatory functions in CD4+ T cells. *PloS one* 6, e24931.
- Janas, M.L., Groves, P., Kienzle, N., and Kelso, A. (2005). IL-2 regulates perforin and granzyme gene expression in CD8+ T cells independently of its effects on survival and proliferation. *J Immunol* 175, 8003-8010.
- Jeon, M.S., Atfield, A., Venuprasad, K., Krawczyk, C., Sarao, R., Elly, C., Yang, C., Arya, S., Bachmaier, K., Su, L., *et al.* (2004). Essential role of the E3 ubiquitin ligase Cbl-b in T cell anergy induction. *Immunity* 21, 167-177.
- Jiang, Y., Qian, W., Hawes, J.W., and Walsh, J.P. (2000a). A domain with homology to neuronal calcium sensors is required for calcium-dependent activation of diacylglycerol kinase alpha. *The Journal of biological chemistry* 275, 34092-34099.
- Jiang, Y., Sakane, F., Kanoh, H., and Walsh, J.P. (2000b). Selectivity of the diacylglycerol kinase inhibitor 3-[2-(4-[bis-(4-fluorophenyl)methylene]-1-piperidinyl)ethyl]-2, 3-dihydro-2-thioxo-4(1H)quinazolinone (R59949) among diacylglycerol kinase subtypes. *Biochemical pharmacology* 59, 763-772.
- Jones, D.R. (2002). Expression of a catalytically inactive form of diacylglycerol kinase a induces sustained signaling through RasGRP. *The FASEB Journal*.
- Jordan, M.S., Boesteanu, A., Reed, A.J., Petrone, A.L., Holenbeck, A.E., Lerman, M.A., Naji, A., and Caton, A.J. (2001). Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nature immunology* 2, 301-306.

- Kaech, S.M., and Ahmed, R. (2001). Memory CD8⁺ T cell differentiation: initial antigen encounter triggers a developmental program in naive cells. *Nature immunology* 2, 415-422.
- Kaech, S.M., Hemby, S., Kersh, E., and Ahmed, R. (2002). Molecular and functional profiling of memory CD8 T cell differentiation. *Cell* 111, 837-851.
- Kagi, D., Ledermann, B., Burki, K., Seiler, P., Odermatt, B., Olsen, K.J., Podack, E.R., Zinkernagel, R.M., and Hengartner, H. (1994). Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature* 369, 31-37.
- Kalia, V., Sarkar, S., Subramaniam, S., Haining, W.N., Smith, K.A., and Ahmed, R. (2010). Prolonged interleukin-2 α expression on virus-specific CD8⁺ T cells favors terminal-effector differentiation in vivo. *Immunity* 32, 91-103.
- Kanangat, S., Blair, P., Reddy, R., Daheshia, M., Godfrey, V., Rouse, B.T., and Wilkinson, E. (1996). Disease in the scurfy (sf) mouse is associated with overexpression of cytokine genes. *European journal of immunology* 26, 161-165.
- Kerdiles, Y.M., Beisner, D.R., Tinoco, R., Dejean, A.S., Castrillon, D.H., DePinho, R.A., and Hedrick, S.M. (2009). Foxo1 links homing and survival of naive T cells by regulating L-selectin, CCR7 and interleukin 7 receptor. *Nature immunology* 10, 176-184.
- Kerdiles, Y.M., Stone, E.L., Beisner, D.R., McGargill, M.A., Ch'en, I.L., Stockmann, C., Katayama, C.D., and Hedrick, S.M. (2010). Foxo transcription factors control regulatory T cell development and function. *Immunity* 33, 890-904.
- Khoshnan, A., Bae, D., Tindell, C.A., and Nel, A.E. (2000). The physical association of protein kinase C θ with a lipid raft-associated inhibitor of kappa B factor kinase (IKK) complex plays a role in the activation of the NF-kappa B cascade by TCR and CD28. *J Immunol* 165, 6933-6940.
- Kim, H.P., Imbert, J., and Leonard, W.J. (2006). Both integrated and differential regulation of components of the IL-2/IL-2 receptor system. *Cytokine & growth factor reviews* 17, 349-366.
- Kim, H.P., and Leonard, W.J. (2002). The basis for TCR-mediated regulation of the IL-2 receptor α chain gene: role of widely separated regulatory elements. *The EMBO journal* 21, 3051-3059.
- Kim, J.M., Rasmussen, J.P., and Rudensky, A.Y. (2007a). Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. *Nature immunology* 8, 191-197.
- Kim, P.S., and Ahmed, R. (2010). Features of responding T cells in cancer and chronic infection. *Current opinion in immunology* 22, 223-230.
- Kim, R., Emi, M., and Tanabe, K. (2007b). Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology* 121, 1-14.
- Krummel, M.F., and Allison, J.P. (1996). CTLA-4 engagement inhibits IL-2 accumulation and cell cycle progression upon activation of resting T cells. *The Journal of experimental medicine* 183, 2533-2540.

- Kurebayashi, Y., Nagai, S., Ikejiri, A., Ohtani, M., Ichiyama, K., Baba, Y., Yamada, T., Egami, S., Hoshii, T., Hirao, A., *et al.* (2012). PI3K-Akt-mTORC1-S6K1/2 axis controls Th17 differentiation by regulating Gfi1 expression and nuclear translocation of RORgamma. *Cell reports* 1, 360-373.
- Laurence, A., Tato, C.M., Davidson, T.S., Kanno, Y., Chen, Z., Yao, Z., Blank, R.B., Meylan, F., Siegel, R., Hennighausen, L., *et al.* (2007). Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity* 26, 371-381.
- Ledbetter, J.A., Imboden, J.B., Schieven, G.L., Grosmaire, L.S., Rabinovitch, P.S., Lindsten, T., Thompson, C.B., and June, C.H. (1990). CD28 ligation in T-cell activation: evidence for two signal transduction pathways. *Blood* 75, 1531-1539.
- Letourneau, S., Krieg, C., Pantaleo, G., and Boyman, O. (2009). IL-2- and CD25-dependent immunoregulatory mechanisms in the homeostasis of T-cell subsets. *The Journal of allergy and clinical immunology* 123, 758-762.
- Levings, M.K., Gregori, S., Tresoldi, E., Cazzaniga, S., Bonini, C., and Roncarolo, M.G. (2005). Differentiation of Tr1 cells by immature dendritic cells requires IL-10 but not CD25+CD4+ Tr cells. *Blood* 105, 1162-1169.
- Levings, M.K., Sangregorio, R., and Roncarolo, M.G. (2001). Human cd25(+)cd4(+) t regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function. *The Journal of experimental medicine* 193, 1295-1302.
- Li, W., Whaley, C.D., Mondino, A., and Mueller, D.L. (1996). Blocked signal transduction to the ERK and JNK protein kinases in anergic CD4+ T cells. *Science* 271, 1272-1276.
- Macian, F., Garcia-Cozar, F., Im, S.H., Horton, H.F., Byrne, M.C., and Rao, A. (2002). Transcriptional mechanisms underlying lymphocyte tolerance. *Cell* 109, 719-731.
- Macintyre, A.N., Finlay, D., Preston, G., Sinclair, L.V., Waugh, C.M., Tamas, P., Feijoo, C., Okkenhaug, K., and Cantrell, D.A. (2011). Protein kinase B controls transcriptional programs that direct cytotoxic T cell fate but is dispensable for T cell metabolism. *Immunity* 34, 224-236.
- Mak, T.W., Saunders, M.E., and Mak, T.W. (2008). *Primer to the immune response* (Amsterdam ; Boston: Academic Press/Elsevier).
- Malek, T.R. (2008). The biology of interleukin-2. *Annual review of immunology* 26, 453-479.
- Malhotra, N., Robertson, E., and Kang, J. (2010). SMAD2 is essential for TGF beta-mediated Th17 cell generation. *The Journal of biological chemistry* 285, 29044-29048.
- Marie, J.C., Letterio, J.J., Gavin, M., and Rudensky, A.Y. (2005). TGF-beta1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4+CD25+ regulatory T cells. *The Journal of experimental medicine* 201, 1061-1067.
- Marie, J.C., Liggitt, D., and Rudensky, A.Y. (2006). Cellular mechanisms of fatal early-onset autoimmunity in mice with the T cell-specific targeting of transforming growth factor-beta receptor. *Immunity* 25, 441-454.

- Martinez, G.J., Zhang, Z., Reynolds, J.M., Tanaka, S., Chung, Y., Liu, T., Robertson, E., Lin, X., Feng, X.H., and Dong, C. (2010). Smad2 positively regulates the generation of Th17 cells. *The Journal of biological chemistry* 285, 29039-29043.
- Martinez-Moreno, M., Garcia-Lievana, J., Soutar, D., Torres-Ayuso, P., Andrada, E., Zhong, X.P., Koretzky, G.A., Merida, I., and Avila-Flores, A. (2012). FoxO-dependent regulation of diacylglycerol kinase alpha gene expression. *Molecular and cellular biology*.
- Mercado, R., Vijh, S., Allen, S.E., Kerksiek, K., Pilip, I.M., and Pamer, E.G. (2000). Early programming of T cell populations responding to bacterial infection. *J Immunol* 165, 6833-6839.
- Merida, I., Avila-Flores, A., and Merino, E. (2008). Diacylglycerol kinases: at the hub of cell signalling. *The Biochemical journal* 409, 1-18.
- Merino, E., Avila-Flores, A., Shirai, Y., Moraga, I., Saito, N., and Merida, I. (2008). Lck-dependent tyrosine phosphorylation of diacylglycerol kinase alpha regulates its membrane association in T cells. *J Immunol* 180, 5805-5815.
- Merino, E., Sanjuan, M.A., Moraga, I., Cipres, A., and Merida, I. (2007). Role of the diacylglycerol kinase alpha-conserved domains in membrane targeting in intact T cells. *The Journal of biological chemistry* 282, 35396-35404.
- Miyamoto, Y.J., Mitchell, J.S., and McIntyre, B.W. (2003). Physical association and functional interaction between beta1 integrin and CD98 on human T lymphocytes. *Molecular immunology* 39, 739-751.
- Moore, M.W., Carbone, F.R., and Bevan, M.J. (1988). Introduction of soluble protein into the class I pathway of antigen processing and presentation. *Cell* 54, 777-785.
- Morgan, D.A., Ruscetti, F.W., and Gallo, R. (1976). Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science* 193, 1007-1008.
- Moriggl, R., Topham, D.J., Teglund, S., Sexl, V., McKay, C., Wang, D., Hoffmeyer, A., van Deursen, J., Sangster, M.Y., Bunting, K.D., *et al.* (1999). Stat5 is required for IL-2-induced cell cycle progression of peripheral T cells. *Immunity* 10, 249-259.
- Mowen, K.A., and Glimcher, L.H. (2004). Signaling pathways in Th2 development. *Immunological reviews* 202, 203-222.
- Mueller, D.L. (2006). Linking diacylglycerol kinase to T cell anergy. *Nature immunology* 7, 1132-1134.
- Mullen, A.C., High, F.A., Hutchins, A.S., Lee, H.W., Villarino, A.V., Livingston, D.M., Kung, A.L., Cereb, N., Yao, T.P., Yang, S.Y., *et al.* (2001). Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12-dependent selection. *Science* 292, 1907-1910.
- Murphy, K., Travers, P., Walport, M., and Janeway, C. (2008). *Janeway's immunobiology*, 7th edn (New York: Garland Science).
- Murphy, K.M., and Stockinger, B. (2010). Effector T cell plasticity: flexibility in the face of changing circumstances. *Nature immunology* 11, 674-680.
- Nakajima, H., Liu, X.W., Wynshaw-Boris, A., Rosenthal, L.A., Imada, K., Finbloom, D.S., Hennighausen, L., and Leonard, W.J. (1997). An indirect effect of Stat5a in IL-2-induced

proliferation: a critical role for Stat5a in IL-2-mediated IL-2 receptor alpha chain induction. *Immunity* 7, 691-701.

Nakamura, K., Kitani, A., and Strober, W. (2001). Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *The Journal of experimental medicine* 194, 629-644.

Nakamura, Y., Russell, S.M., Mess, S.A., Friedmann, M., Erdos, M., Francois, C., Jacques, Y., Adelstein, S., and Leonard, W.J. (1994). Heterodimerization of the IL-2 receptor beta- and gamma-chain cytoplasmic domains is required for signalling. *Nature* 369, 330-333.

Nelson, B.H., Lord, J.D., and Greenberg, P.D. (1994). Cytoplasmic domains of the interleukin-2 receptor beta and gamma chains mediate the signal for T-cell proliferation. *Nature* 369, 333-336.

Obar, J.J., Molloy, M.J., Jellison, E.R., Stoklasek, T.A., Zhang, W., Usherwood, E.J., and Lefrancois, L. (2010). CD4+ T cell regulation of CD25 expression controls development of short-lived effector CD8+ T cells in primary and secondary responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 193-198.

Oderup, C., Cederbom, L., Makowska, A., Cilio, C.M., and Ivars, F. (2006). Cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4+ CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression. *Immunology* 118, 240-249.

Ohkusu-Tsukada, K., Toda, M., Udono, H., Kawakami, Y., and Takahashi, K. (2010). Targeted inhibition of IL-10-secreting CD25- Treg via p38 MAPK suppression in cancer immunotherapy. *European journal of immunology* 40, 1011-1021.

Okkenhaug, K., Bilancio, A., Farjot, G., Priddle, H., Sancho, S., Peskett, E., Pearce, W., Meek, S.E., Salpekar, A., Waterfield, M.D., *et al.* (2002). Impaired B and T cell antigen receptor signaling in p110delta PI 3-kinase mutant mice. *Science* 297, 1031-1034.

Okkenhaug, K., Patton, D.T., Bilancio, A., Garcon, F., Rowan, W.C., and Vanhaesebroeck, B. (2006). The p110delta isoform of phosphoinositide 3-kinase controls clonal expansion and differentiation of Th cells. *J Immunol* 177, 5122-5128.

Olenchock, B.A., Guo, R., Carpenter, J.H., Jordan, M., Topham, M.K., Koretzky, G.A., and Zhong, X.P. (2006). Disruption of diacylglycerol metabolism impairs the induction of T cell anergy. *Nature immunology* 7, 1174-1181.

Ouyang, W., and Li, M.O. (2011). Foxo: in command of T lymphocyte homeostasis and tolerance. *Trends in immunology* 32, 26-33.

Pace, L., Tempez, A., Arnold-Schrauf, C., Lemaitre, F., Bousso, P., Fetler, L., Sparwasser, T., and Amigorena, S. (2012). Regulatory T cells increase the avidity of primary CD8+ T cell responses and promote memory. *Science* 338, 532-536.

Pardigon, N., Bercovici, N., Calbo, S., Santos-Lima, E.C., Liblau, R., Kourilsky, P., and Abastado, J.P. (1998). Role of co-stimulation in CD8+ T cell activation. *International immunology* 10, 619-630.

- Pattanapanyasat, K., and Hoy, T.G. (1991). Expression of cell surface transferrin receptor and intracellular ferritin after in vitro stimulation of peripheral blood T lymphocytes. *European journal of haematology* 47, 140-145.
- Pfoertner, S., Jeron, A., Probst-Kepper, M., Guzman, C.A., Hansen, W., Westendorf, A.M., Toepfer, T., Schrader, A.J., Franzke, A., Buer, J., *et al.* (2006). Signatures of human regulatory T cells: an encounter with old friends and new players. *Genome biology* 7, R54.
- Pipkin, M.E., Sacks, J.A., Cruz-Guilloty, F., Lichtenheld, M.G., Bevan, M.J., and Rao, A. (2010). Interleukin-2 and inflammation induce distinct transcriptional programs that promote the differentiation of effector cytolytic T cells. *Immunity* 32, 79-90.
- Pot, C., Apetoh, L., Awasthi, A., and Kuchroo, V.K. (2011). Induction of regulatory Tr1 cells and inhibition of T(H)17 cells by IL-27. *Seminars in immunology* 23, 438-445.
- Prager, G.W., Feral, C.C., Kim, C., Han, J., and Ginsberg, M.H. (2007). CD98hc (SLC3A2) interaction with the integrin beta subunit cytoplasmic domain mediates adhesive signaling. *The Journal of biological chemistry* 282, 24477-24484.
- Preece, G., Murphy, G., and Ager, A. (1996). Metalloproteinase-mediated regulation of L-selectin levels on leucocytes. *The Journal of biological chemistry* 271, 11634-11640.
- Prinz, P.U., Mendler, A.N., Masouris, I., Durner, L., Oberneder, R., and Noessner, E. (2012). High DGK-alpha and disabled MAPK pathways cause dysfunction of human tumor-infiltrating CD8+ T cells that is reversible by pharmacologic intervention. *J Immunol* 188, 5990-6000.
- Raben, D.M., and Wattenberg, B.W. (2009). Signaling at the membrane interface by the DGK/SK enzyme family. *J Lipid Res* 50 Suppl, S35-39.
- Rainero, E., Caswell, P.T., Muller, P.A., Grindlay, J., McCaffrey, M.W., Zhang, Q., Wakelam, M.J., Vousden, K.H., Graziani, A., and Norman, J.C. (2012). Diacylglycerol kinase alpha controls RCP-dependent integrin trafficking to promote invasive migration. *The Journal of cell biology* 196, 277-295.
- Reem, G.H., and Yeh, N.H. (1984). Interleukin 2 regulates expression of its receptor and synthesis of gamma interferon by human T lymphocytes. *Science* 225, 429-430.
- Riese, M.J., Grewal, J., Das, J., Zou, T., Patil, V., Chakraborty, A.K., and Koretzky, G.A. (2011). Decreased diacylglycerol metabolism enhances ERK activation and augments CD8+ T cell functional responses. *The Journal of biological chemistry* 286, 5254-5265.
- Rincon, E., Gharbi, S.I., Santos-Mendoza, T., and Merida, I. (2012). Diacylglycerol kinase zeta: at the crossroads of lipid signaling and protein complex organization. *Progress in lipid research* 51, 1-10.
- Rincon, E., Santos, T., Avila-Flores, A., Albar, J.P., Lalioti, V., Lei, C., Hong, W., and Merida, I. (2007). Proteomics identification of sorting nexin 27 as a diacylglycerol kinase zeta-associated protein: new diacylglycerol kinase roles in endocytic recycling. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 6, 1073-1087.
- Rintoul, R.C., BATTERY, R.C., Mackinnon, A.C., Wong, W.S., Mosher, D., Haslett, C., and Sethi, T. (2002). Cross-linking CD98 promotes integrin-like signaling and anchorage-independent growth. *Molecular biology of the cell* 13, 2841-2852.

- Roncarolo, M.G., Gregori, S., Battaglia, M., Bacchetta, R., Fleischhauer, K., and Levings, M.K. (2006). Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunological reviews* 212, 28-50.
- Russell, W.L., Russell, L.B., and Gower, J.S. (1959). Exceptional Inheritance of a Sex-Linked Gene in the Mouse Explained on the Basis That the X/O Sex-Chromosome Constitution Is Female. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 45, 554-560.
- Sadra, A., Cinek, T., Arellano, J.L., Shi, J., Truitt, K.E., and Imboden, J.B. (1999). Identification of tyrosine phosphorylation sites in the CD28 cytoplasmic domain and their role in the costimulation of Jurkat T cells. *J Immunol* 162, 1966-1973.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., and Toda, M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155, 1151-1164.
- Sakane, F., Imai, S., Kai, M., Yasuda, S., and Kanoh, H. (2007). Diacylglycerol kinases: why so many of them? *Biochimica et biophysica acta* 1771, 793-806.
- Sakane, F., Yamada, K., Kanoh, H., Yokoyama, C., and Tanabe, T. (1990). Porcine diacylglycerol kinase sequence has zinc finger and E-F hand motifs. *Nature* 344, 345-348.
- Sanjabi, S., Mosaheb, M.M., and Flavell, R.A. (2009). Opposing effects of TGF-beta and IL-15 cytokines control the number of short-lived effector CD8+ T cells. *Immunity* 31, 131-144.
- Sanjuan, M.A., Jones, D.R., Izquierdo, M., and Merida, I. (2001). Role of diacylglycerol kinase alpha in the attenuation of receptor signaling. *The Journal of cell biology* 153, 207-220.
- Sanjuan, M.A., Pradet-Balade, B., Jones, D.R., Martinez, A.C., Stone, J.C., Garcia-Sanz, J.A., and Merida, I. (2003). T cell activation in vivo targets diacylglycerol kinase alpha to the membrane: a novel mechanism for Ras attenuation. *J Immunol* 170, 2877-2883.
- Santos, T., Carrasco, S., Jones, D.R., Merida, I., and Eguinoa, A. (2002). Dynamics of diacylglycerol kinase zeta translocation in living T-cells. Study of the structural domain requirements for translocation and activity. *The Journal of biological chemistry* 277, 30300-30309.
- Sanzone, S., Zeyda, M., Saemann, M.D., Soncini, M., Holter, W., Fritsch, G., Knapp, W., Candotti, F., Stulnig, T.M., and Parolini, O. (2003). SLAM-associated protein deficiency causes imbalanced early signal transduction and blocks downstream activation in T cells from X-linked lymphoproliferative disease patients. *The Journal of biological chemistry* 278, 29593-29599.
- Saraiva, M., Christensen, J.R., Veldhoen, M., Murphy, T.L., Murphy, K.M., and O'Garra, A. (2009). Interleukin-10 production by Th1 cells requires interleukin-12-induced STAT4 transcription factor and ERK MAP kinase activation by high antigen dose. *Immunity* 31, 209-219.
- Sauer, S., Bruno, L., Hertweck, A., Finlay, D., Leleu, M., Spivakov, M., Knight, Z.A., Cobb, B.S., Cantrell, D., O'Connor, E., *et al.* (2008). T cell receptor signaling controls

Foxp3 expression via PI3K, Akt, and mTOR. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105, 7797-7802.

Schreiber, R.D., Old, L.J., and Smyth, M.J. (2011). Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. Science 331, 1565-1570.

Setoguchi, R., Hori, S., Takahashi, T., and Sakaguchi, S. (2005). Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. The Journal of experimental medicine 201, 723-735.

Shin, J., O'Brien, T.F., Grayson, J.M., and Zhong, X.P. (2012). Differential regulation of primary and memory CD8 T cell immune responses by diacylglycerol kinases. J Immunol 188, 2111-2117.

Siliceo, M., Garcia-Bernal, D., Carrasco, S., Diaz-Flores, E., Coluccio Leskow, F., Teixeira, J., Kazanietz, M.G., and Merida, I. (2006). Beta2-chimaerin provides a diacylglycerol-dependent mechanism for regulation of adhesion and chemotaxis of T cells. Journal of cell science 119, 141-152.

Smith-Garvin, J.E., Koretzky, G.A., and Jordan, M.S. (2009). T cell activation. Annual review of immunology 27, 591-619.

Soto-Nieves, N., Puga, I., Abe, B.T., Bandyopadhyay, S., Baine, I., Rao, A., and Macian, F. (2009). Transcriptional complexes formed by NFAT dimers regulate the induction of T cell tolerance. The Journal of experimental medicine 206, 867-876.

Stauber, D.J., Debler, E.W., Horton, P.A., Smith, K.A., and Wilson, I.A. (2006). Crystal structure of the IL-2 signaling complex: paradigm for a heterotrimeric cytokine receptor. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103, 2788-2793.

Staveley-O'Carroll, K., Sotomayor, E., Montgomery, J., Borrello, I., Hwang, L., Fein, S., Pardoll, D., and Levitsky, H. (1998). Induction of antigen-specific T cell anergy: An early event in the course of tumor progression. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95, 1178-1183.

Stockinger, B. (1999). T lymphocyte tolerance: from thymic deletion to peripheral control mechanisms. Advances in immunology 71, 229-265.

Stockinger, B. (2007). Good for Goose, but not for Gander: IL-2 interferes with Th17 differentiation. Immunity 26, 278-279.

Stumhofer, J.S., Silver, J.S., Laurence, A., Porrett, P.M., Harris, T.H., Turka, L.A., Ernst, M., Saris, C.J., O'Shea, J.J., and Hunter, C.A. (2007). Interleukins 27 and 6 induce STAT3-mediated T cell production of interleukin 10. Nature immunology 8, 1363-1371.

Suomalainen, H.A. (1986). The monoclonal antibodies Trop-4 and 4F2 detect the same membrane antigen that is expressed at an early stage of lymphocyte activation and is retained on secondary lymphocytes. J Immunol 137, 422-427.

Suzuki, H., Kundig, T.M., Furlonger, C., Wakeham, A., Timms, E., Matsuyama, T., Schmits, R., Simard, J.J., Ohashi, P.S., Griesser, H., *et al.* (1995). Deregulated T cell activation and autoimmunity in mice lacking interleukin-2 receptor beta. Science 268, 1472-1476.

- Szabo, S.J., Kim, S.T., Costa, G.L., Zhang, X., Fathman, C.G., and Glimcher, L.H. (2000). A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 100, 655-669.
- Tadokoro, C.E., Shakhar, G., Shen, S., Ding, Y., Lino, A.C., Maraver, A., Lafaille, J.J., and Dustin, M.L. (2006). Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4+ T cells and dendritic cells in vivo. *The Journal of experimental medicine* 203, 505-511.
- Tai, X., Cowan, M., Feigenbaum, L., and Singer, A. (2005). CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2. *Nature immunology* 6, 152-162.
- Takahashi, T., Tagami, T., Yamazaki, S., Uede, T., Shimizu, J., Sakaguchi, N., Mak, T.W., and Sakaguchi, S. (2000). Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *The Journal of experimental medicine* 192, 303-310.
- Takeda, K., Harada, Y., Watanabe, R., Inutake, Y., Ogawa, S., Onuki, K., Kagaya, S., Tanabe, K., Kishimoto, H., and Abe, R. (2008). CD28 stimulation triggers NF-kappaB activation through the CARMA1-PKCtheta-Grb2/Gads axis. *International immunology* 20, 1507-1515.
- Taniguchi, T., and Minami, Y. (1993). The IL-2/IL-2 receptor system: a current overview. *Cell* 73, 5-8.
- Thomas, D.A., and Massague, J. (2005). TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer cell* 8, 369-380.
- Thornton, A.M., and Shevach, E.M. (1998). CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *The Journal of experimental medicine* 188, 287-296.
- Tischner, D., Wiegers, G.J., Fiegl, H., Drach, M., and Villunger, A. (2012). Mutual antagonism of TGF-beta and Interleukin-2 in cell survival and lineage commitment of induced regulatory T cells. *Cell death and differentiation* 19, 1277-1287.
- Topham, M.K., and Epand, R.M. (2009). Mammalian diacylglycerol kinases: molecular interactions and biological functions of selected isoforms. *Biochimica et biophysica acta* 1790, 416-424.
- Turner, M.S., Kane, L.P., and Morel, P.A. (2009). Dominant role of antigen dose in CD4+Foxp3+ regulatory T cell induction and expansion. *J Immunol* 183, 4895-4903.
- van Stipdonk, M.J., Lemmens, E.E., and Schoenberger, S.P. (2001). Naive CTLs require a single brief period of antigenic stimulation for clonal expansion and differentiation. *Nature immunology* 2, 423-429.
- Vang, K.B., Yang, J., Mahmud, S.A., Burchill, M.A., Vegoe, A.L., and Farrar, M.A. (2008). IL-2, -7, and -15, but not thymic stromal lymphopoietin, redundantly govern CD4+Foxp3+ regulatory T cell development. *J Immunol* 181, 3285-3290.
- Wahl, S.M., and Chen, W. (2003). TGF-beta: how tolerant can it be? *Immunologic research* 28, 167-179.
- Wang, X., Rickert, M., and Garcia, K.C. (2005). Structure of the quaternary complex of interleukin-2 with its alpha, beta, and gammac receptors. *Science* 310, 1159-1163.

- Waugh, C., Sinclair, L., Finlay, D., Bayascas, J.R., and Cantrell, D. (2009). Phosphoinositide (3,4,5)-triphosphate binding to phosphoinositide-dependent kinase 1 regulates a protein kinase B/Akt signaling threshold that dictates T-cell migration, not proliferation. *Molecular and cellular biology* 29, 5952-5962.
- Wells, A.D., Walsh, M.C., Bluestone, J.A., and Turka, L.A. (2001). Signaling through CD28 and CTLA-4 controls two distinct forms of T cell anergy. *The Journal of clinical investigation* 108, 895-903.
- Weninger, W., Crowley, M.A., Manjunath, N., and von Andrian, U.H. (2001). Migratory properties of naive, effector, and memory CD8(+) T cells. *The Journal of experimental medicine* 194, 953-966.
- Wildin, R.S., Ramsdell, F., Peake, J., Faravelli, F., Casanova, J.L., Buist, N., Levy-Lahad, E., Mazzella, M., Goulet, O., Perroni, L., *et al.* (2001). X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nature genetics* 27, 18-20.
- Wohlfert, E.A., Callahan, M.K., and Clark, R.B. (2004). Resistance to CD4+CD25+ regulatory T cells and TGF-beta in Cbl-b^{-/-} mice. *J Immunol* 173, 1059-1065.
- Wohlfert, E.A., Gorelik, L., Mittler, R., Flavell, R.A., and Clark, R.B. (2006). Cutting edge: deficiency in the E3 ubiquitin ligase Cbl-b results in a multifunctional defect in T cell TGF-beta sensitivity in vitro and in vivo. *J Immunol* 176, 1316-1320.
- Won, J., Kim, H., Park, E.J., Hong, Y., Kim, S.J., and Yun, Y. (1999). Tumorigenicity of mouse thymoma is suppressed by soluble type II transforming growth factor beta receptor therapy. *Cancer research* 59, 1273-1277.
- Yang, S., Liu, F., Wang, Q.J., Rosenberg, S.A., and Morgan, R.A. (2011a). The shedding of CD62L (L-selectin) regulates the acquisition of lytic activity in human tumor reactive T lymphocytes. *PloS one* 6, e22560.
- Yang, X.P., Ghoreschi, K., Steward-Tharp, S.M., Rodriguez-Canales, J., Zhu, J., Grainger, J.R., Hirahara, K., Sun, H.W., Wei, L., Vahedi, G., *et al.* (2011b). Opposing regulation of the locus encoding IL-17 through direct, reciprocal actions of STAT3 and STAT5. *Nature immunology* 12, 247-254.
- Ylikoski, E., Lund, R., Kylanemi, M., Filen, S., Kilpelainen, M., Savolainen, J., and Lahesmaa, R. (2005). IL-12 up-regulates T-bet independently of IFN-gamma in human CD4+ T cells. *European journal of immunology* 35, 3297-3306.
- Yu, A., Zhu, L., Altman, N.H., and Malek, T.R. (2009). A low interleukin-2 receptor signaling threshold supports the development and homeostasis of T regulatory cells. *Immunity* 30, 204-217.
- Yu, X., Abe, R., and Hodes, R.J. (1998). The role of B7-CD28 co-stimulation in tumor rejection. *International immunology* 10, 791-797.
- Zha, Y., Marks, R., Ho, A.W., Peterson, A.C., Janardhan, S., Brown, I., Praveen, K., Stang, S., Stone, J.C., and Gajewski, T.F. (2006). T cell anergy is reversed by active Ras and is regulated by diacylglycerol kinase-alpha. *Nature immunology* 7, 1166-1173.

-
- Zheng, S.G., Wang, J., Wang, P., Gray, J.D., and Horwitz, D.A. (2007a). IL-2 is essential for TGF-beta to convert naive CD4+CD25- cells to CD25+Foxp3+ regulatory T cells and for expansion of these cells. *J Immunol* 178, 2018-2027.
- Zheng, Y., Collins, S.L., Lutz, M.A., Allen, A.N., Kole, T.P., Zarek, P.E., and Powell, J.D. (2007b). A role for mammalian target of rapamycin in regulating T cell activation versus anergy. *J Immunol* 178, 2163-2170.
- Zheng, Y., Delgoffe, G.M., Meyer, C.F., Chan, W., and Powell, J.D. (2009). Anergic T cells are metabolically anergic. *J Immunol* 183, 6095-6101.
- Zheng, Y., Zha, Y., Driessens, G., Locke, F., and Gajewski, T.F. (2012). Transcriptional regulator early growth response gene 2 (Egr2) is required for T cell anergy in vitro and in vivo. *The Journal of experimental medicine* 209, 2157-2163.
- Zhong, X.P., Hainey, E.A., Olenchok, B.A., Jordan, M.S., Maltzman, J.S., Nichols, K.E., Shen, H., and Koretzky, G.A. (2003). Enhanced T cell responses due to diacylglycerol kinase zeta deficiency. *Nature immunology* 4, 882-890.
- Zhou, L., Chong, M.M., and Littman, D.R. (2009). Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. *Immunity* 30, 646-655.
- Zhu, J., Cote-Sierra, J., Guo, L., and Paul, W.E. (2003). Stat5 activation plays a critical role in Th2 differentiation. *Immunity* 19, 739-748.

AGRADECIMIENTOS

Después del camino recorrido, quiero dar las gracias a la gente que me ha ayudado, acompañado y apoyado durante estos años.

En primer lugar quiero darle las gracias a Isabel por haberme dado la oportunidad de realizar la tesis en su laboratorio, por hacerme comprender el mundo de las DGKs, y porque juntas hemos llevado a cabo un proyecto que ha dado lugar a resultados muy interesantes, y eso “mola”. También quiero darle las gracias a Toñi, por ayudarme tanto, por aportar tantas ideas y por enseñarme a no desesperar cuando todo sale al revés de lo que esperabas.

Quiero dar las gracias a toda la gente de mi grupo, que siempre ha estado allí para ayudarme: a Pedro, por sus consejos, quinasas, invitaciones a cañas y viajes, y por su ayuda cuando la he necesitado. A Rosa, que lleva todos los ratones del laboratorio y sin ella no habría sido posible este proyecto. A Raquel, que nos mantiene el laboratorio para que no nos falte de nada. A Severine y Mónica, por sus consejos y reflexiones. A las nuevas generaciones: Gonzalo, María Tello y Elena, vais a conseguir grandes logros, ya veréis. Quiero mencionar además a nuestras compañeras de laboratorio del grupo de Mar y las chicas de Hugh: Eva, Sheila, Miriam y Gloria. Gracias por los desayunos y por aguantarnos en el labo.

También son importantes los que ya no están y que han formado parte de todo esto: Esther, María Almena, María Siliceo y M^aÁngeles. Ángel, fuiste el que me enseñaste el secreto de los blots, las líneas celulares y las fosforilaciones, gracias por tus enseñanzas y por los bocatas en el pabellón B. A mis DIODas Anabel e Irene. Irene, gracias por estar ahí siempre. Tu paso por el labo me dejó algo que quedará siempre: tu amistad incondicional.

Quiero agradecer a la gente del 413 Chechu, Vir, Vero y Abel por su ayuda y comentarios. A Javi y Vicen (*happy but not crazy team*) por su admirable buen humor ante todo. A Rosita, Araceli, Ángeles, Ali y Gema. Por ser tan buena gente, por ayudarme cuando lo he necesitado e intentar obligarme a ir de cañas (cuando también lo he necesitado). Ali, tu ayuda desde la distancia con los tumores ha sido inestimable. A Bea y Lola, por las clases de pilates, por su amistad y consejos, y por las reuniones (que ya va siendo hora de una nueva quedada, eh).

No me olvido de la gente del 416: Rubén, Laura B, Laura M, Graciela y Anabel, siempre de buen humor y dispuestos a ayudar. Borja, gracias por tus buenos consejos y por nuestros piques varios. Dimitri, gracias por las visitas a mi mesa para saber qué tal me iba y por escucharme cuando lo he necesitado. Juls, gracias por ayudarme con la maquetación, por las coca-colas contándonos nuestras cosas, por entenderme y dar tu opinión sincera para poder ayudarme, eso es algo que casi no se encuentra: la amistad.

Importante agradecer la ayuda recibida por mis otros compañeros del día a día: la gente del Servicio de citometría: Mari Carmen, Sara, Sonia, Almu y Pablo. Porque me han enseñado mucho y son parte de este trabajo también, sin ellos no habría sido posible. También darle las gracias al resto de los servicios del DIO, que nos facilitan el trabajo del día a día: Coral, Antonio, Cathy, Ana y Meyos.

Quiero también agradecer a la gente de los anteriores laboratorios en los que he estado, porque todos han aportado a mi formación científica y como persona. A los “linfómanos” del CNIO: Dani, Lore, Espe, Beas, Magda, y un largo etcétera, por enseñarme lo bonita que puede ser la ciencia, y que a pesar de lo que suceda a tu alrededor lo más importante es que haya buen rollo. A Sonsoles Hortelano y Raquel López-Fontal, que me acogieron un verano en el CNIC y me enseñaron un montón de técnicas que me dejaron los tres meses con la boca abierta. Al grupo de la Facultad de Biología de la UCM de Rosa Gomáriz y Javier Leceta, por dejarme entrar en su laboratorio cuando no sabía coger una pipeta y permitir que aprendiera a trastear.

Quiero mencionar también a la gente que aunque pasen años sin vernos siempre están ahí si lo necesito: Miriam, David, Patricia Redondo y Patricia Santos.

Este trabajo no habría posible sin el apoyo de mi familia. Quiero agradecer a mis padres su esfuerzo para que pudiera tener a mi alcance todo lo que yo quisiera aprender. Gracias por cuidarme, ayudarme tanto, enseñarme que hay que saber de todas las parcelas de la vida, e inculcarme ese afán de conocimiento que me ha llevado a emprender este viaje.

Y por último, quiero agradecerte a ti Miguel, que has estado todos estos años a mi lado animándome y enseñándome a ver los progresos que estaba consiguiendo, y no dejando que cayera cuando las cosas no iban bien o lo veía todo negro. He aprendido muchísimo de tu ejemplo y madurado gracias a tu esfuerzo, sin ti definitivamente esto no habría sido posible.

ANEXOS

ARTÍCULOS PUBLICADOS

- **FoxO-dependent regulation of diacylglycerol kinase α gene expression** Mónica Martinez-Moreno, Job Garcia-Liévana, Denise Soutar , Pedro Torres-Ayuso, Elena Andrada, Xiao-Ping Zhong, Gary Koretzky, Isabel Merida and Antonia Avila-Flores. *Molecular and Cellular Biology* 2012, 32(20):4168.

- **PKC α transient shuttling to the immunological synapse is governed by DGK ζ and regulates L-selectin shedding.** Severine Gharbi, Antonia Avila-Flores, Denise Soutar, Ana Orive, Gary Koretzky, Juan Pablo Albar, and Isabel Merida. *Journal of Cell Science* 2013 Mar 22.

ARTÍCULOS EN PREPARACION

- **DGK α requirement for tumor immune response.** Denise Soutar, Antonia Avila-Flores, Rosa María Liébana, Gary Koretzky, and Isabel Merida.

- **DGK α regulation of IL2- regulated responses.** Denise Soutar, Antonia Avila-Flores, Mónica Martinez-Moreno, Gary Koretzky and Isabel Merida.